

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Ingeniería Química

**RECUPERACIÓN DE POLIFENOLES PROCEDENTES DE
RESIDUOS AGROALIMENTARIOS MEDIANTE LA APLICACIÓN
DE TECNOLOGÍAS DE MEMBRANAS**



Memoria y Anexos

Autor:	Pol Mestre Tosas
Director:	José Luis Cortina Pallas
Co-Director:	Xanel Vecino Bello
Convocatoria:	Junio 2020

Resum

L'objectiu principal d'aquest treball consisteix en l'extracció dels polifenols presents en el residus de la indústria del vi (e.g., lies del vi) y de l'oli d'oliva (e.g., orujo d'oli) i el seu posterior tractament amb diferents tècniques de membranes per la seva separació i/o concentració. Les tècniques de membranes utilitzades són la ultrafiltració (UF), nanofiltració (NF) i osmosi inversa (OI).

Per l'extracció de polifenols s'ha utilitzat una tècnica tradicional com és la maceració, amb les següents condicions experimentals: realitzant extraccions de 10 minuts, amb agitació a 350 rpm, sense ajust de pH (aproximadament 5) i a 70°C amb una relació sòlid:líquid de 1:30 (g/mL) i a 25°C amb una proporció sòlid:líquid 1:100 (g/mL) per els residus de lies del vi i orujo d'oli, respectivament. Els extractes amb major contingut en polifenols son els obtinguts a partir de l'orujo d'oli, amb una concentració de 173 mg/L, mentre que els extractes de les lies del vi contenen 33 mg/L.

D'altre banda, una cop extrets els polifenols dels residus agroalimentaris, aquests s'han tractat amb diferents tecnologies de membranes. En primer lloc, s'ha fet servir un mòdul de membranes a petita escala en el laboratori (113 cm²) i amb els resultats obtinguts s'ha plantejat un tren de membranes per cadascun dels extractes objectius d'estudi (lies del vi i orujo d'oli). També s'ha dut a terme un escalat del procés de membranes en una planta plana (140 cm²) amb dues membranes de nanofiltració (DURACID y NF90) i l'extracte de lies del vi. En els processos de membranes s'ha considerat la concentració total de polifenols així com les diferents famílies de polifenols que componen els extractes (e.g. hidroxibenzoics (HB), hidroxicinàmics (HC) i flavonoides).

Amb les membranes d'UF, de 30 kDa i 50 kDa, s'obtenen uns valors de rebuig que indiquen una capacitat per separar els polifenols. La membrana de 30 kDa proporciona els majors percentatges de rebuig en UF, 41,8% en l'extracte de lies del vi. D'altre banda, en el cas de les mostres d'orujo d'oli el rebuig més elevat, també amb la membrana de 30 kDa, es del 45%.

Els trens de membranes plantejats estan formats d'etapes d'UF i NF, per separar els polifenols per famílies. Un cop separades les famílies de polifenols en diferents corrents, aquests es tracten amb membranes d'OI per concentrar el contingut de polifenols.

Finalment, l'escalat realitzat amb la planta plana, amb les membranes de NF testades, mostra uns percentatges de rebuig de polifenols totals més elevats que els obtinguts a petita escala (87% i 90% versus 70% i 80% amb les membranes DURACID i NF90, respectivament, i l'extracte de lies del vi).

Resumen

El objetivo principal de este trabajo consiste en la extracción de los polifenoles presentes en los residuos de la industria del vino (e.g., lías de vino) y del aceite de oliva (e.g., orujo de aceite) y su posterior tratamiento con diferentes técnicas de membranas para su separación y/o concentración. Las técnicas de membranas utilizadas son la ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y osmosis inversa (OI).

Para la extracción de polifenoles se ha utilizado una técnica tradicional como es la maceración, con las siguientes condiciones experimentales: realizando extracciones de 10 minutos, con agitación a 350 rpm, sin ajuste de pH (aproximadamente 5) y a 70°C con una relación sólido: líquido de 1:30 (g/mL) y a 25°C con una proporción sólido: líquido 1:100 (g/mL) para los residuos de lías del vino y orujo de aceite, respectivamente. Los extractos con mayor contenido en polifenoles son los obtenidos a partir del orujo de aceite, con una concentración de 173 mg/L, mientras que los extractos de las lías de vino contienen 33 mg/L.

Por otra parte, una vez extraídos los polifenoles de los residuos agroalimentarios, éstos se han tratado con diferentes tecnologías de membranas. En primer lugar, se ha empleado un módulo de membranas a pequeña escala en el laboratorio (113 cm²) y con los resultados obtenidos se ha planteado un tren de membranas para cada uno de extractos objeto de estudio (lías de vino y orujo de aceite). También se ha llevado a cabo un escalado del proceso de membranas en una planta plana (140 cm²) con dos membranas de nanofiltración (DURACID y NF90) y el extracto de lías de vino. En los procesos de membranas se ha considerado la concentración total de polifenoles así como las diferentes familias de polifenoles que componen los extractos (e.g., hidroxibenzoicos (HB), hidroxicinámicos (HC) y flavonoides).

Con las membranas de UF, de 30 kDa y 50 kDa, se obtienen unos valores de rechazo que indican una capacidad para separar los polifenoles. La membrana de 30 kDa proporciona los mayores porcentajes de rechazo en UF, 41,8% en el extracto de lías de vino. Por otro lado, en el caso de las muestras de orujo de aceite el rechazo más elevado, también con la membrana de 30 kDa, es del 45%.

Los trenes de membranas planteados consisten en una serie de etapas de UF y NF, para separar los polifenoles por familias. Una vez separadas las familias de polifenoles en diferentes corrientes, estas se tratan con membranas de OI para concentrar los polifenoles.

Finalmente, el escalado realizado con la planta plana, con las membranas de nanofiltración testadas, muestra unos porcentajes de rechazo de polifenoles totales más elevados que los obtenidos a pequeña escala (87% y 90% versus 70% y 80% con las membranas DURACID y NF90, respectivamente, y el extracto de lías del vino).

Abstract

The main objective of this study consists on the extraction of the polyphenols present in waste produced from the wine (e.g., lees of wine) and olive oil industry (e.g., olive oil pomaces) and their following treatment with membrane techniques for the separation and/or concentration of polyphenols. The membrane techniques used are ultrafiltration (UF), nanofiltration (NF) and reverse osmosis (RO).

A traditional technique called maceration has been used for the extraction of polyphenols, under the next conditions: 10 minutes extractions, with agitation at 350 rpm, without variation of pH (approximately 5), and at 70°C with a solid:liquid ratio of 1:30 (g/mL) and 25°C with a solid:liquid ratio of 1:30 (g/mL) for the lees and olive oil pomaces respectively. The extracts with a higher content in polyphenols are the ones obtained through the olive oil pomaces, with a concentration of 173 mg/L, while the lees of wine extracts had a concentration of 33 mg/L.

Once the polyphenols have been extracted, they have been treated with several membrane technologies. On the first place, the extracts have been treated with a small level laboratory membrane cell (113 cm²), and with the results it has been proposed a membrane train with every extract (lees of wine and olive oil pomaces). The lees extract also has been treated on a flat sheet plant (140 cm²) with two NF membranes (DURACID and NF90). All the samples from the experiments have been analysed and it has been determined the total polyphenol content and the polyphenol content divided into different families: hydroxibenzoics (HB), hydroxycynamics (HC) and flavonoids.

The results obtained with the UF membranes, of 30 kDa and 50 kDa, show a capacity to separate polyphenols. The 30 kDa membrane has obtained the higher rejection percentage of the UF, 41,8% for the lees extract and 45% for the olive oil pomaces.

The membrane trains raised, are composed of UF and NF, so the polyphenols could be separated by families, and finally, all the final streams are treated with RO membranes to concentrate the content of polyphenols.

Finally, the scale-up with the flat sheet plant, NF membranes and lees of wine extracts, showed higher rejection percentages of total polyphenols than the ones obtained on a small level, (87% and 90% versus 70% and 80% with DURACID and NF90 membranes respectively)



Agradecimientos

Esta investigación ha sido respaldada por el proyecto Waste2Product (ref. CTM2014-57302-R) y por el proyecto RMIT (ref. CTM2017-85346-R) financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad español (MINECO) y por el Gobierno Catalán (2017-SGR-312), España.

Me gustaría agradecer a José Luis Cortina, director del proyecto, por confiar en mí para la realización de este, así como la posibilidad de realizar parte del trabajo de manera experimental en el laboratorio, además de su seguimiento e implicación en el proyecto.

En segundo lugar, agradecer a Xanel Vecino y Mònica Reig la dedicación y el seguimiento diario del proyecto, así como las indicaciones y consejos en el laboratorio. También agradezco enormemente la ayuda en la redacción de esta memoria, y las indicaciones con las que poder acabarla, pese a la situación excepcional vivida debido al estado de alarma por el Covid-19.

Por otro lado, agradezco la ayuda y el consejo recibido los primeros días en el laboratorio por parte de Ferran Val, además del interés y consejo durante toda la realización del proyecto. Agradezco también la ayuda recibida en la Universidad de Barcelona por Paulina Tapia, guiándome y supervisando mis primeros días allí, así como dando soporte y consejo para la interpretación de los resultados.

Finalmente, agradecer el soporte de mi familia, amigos y de mis compañeros de laboratorio Adriana Mateu, Laia Mateu, Claudia Pastor y Adrià Carmona por ser el principal apoyo durante este proyecto de final de grado.



Índice

RESUM	I
RESUMEN	II
ABSTRACT	III
AGRADECIMIENTOS	V
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Objetivos del trabajo	9
1.2. Alcance del proyecto	9
2. ESTADO DEL ARTE	11
2.1. Economía circular	11
2.2. Polifenoles.....	12
2.3. Residuos de la producción de vino y aceite	14
2.4. Extracción de polifenoles	17
2.5. Tecnología de membranas.....	21
2.5.1. Ultrafiltración	23
2.5.2. Nanofiltración y osmosis inversa	24
2.6. Otros métodos de separación y/o concentración de polifenoles.....	25
2.6.1. Tratamiento con resinas	25
2.6.2. Tratamiento de cromatografía extractiva.....	28
2.7. Propuesta de tren de separación y/o concentración de polifenoles	31
3. MATERIALES Y MÉTODOS	33
3.1. Extracción de polifenoles	33
3.1.1. Procedimiento.....	34
3.2. Separación y/o concentración de polifenoles con tecnología de membranas	35
3.2.1. Membranas	35
3.2.2. Módulo memHPLC.....	36
3.2.3. Procedimiento del módulo memHPLC.....	36
3.2.4. Planta plana.....	37
3.2.5. Montaje y funcionamiento de la planta plana	40
3.2.6. Tratamiento de datos	43
3.3. Determinación de polifenoles	44
4. RESULTADOS EXPERIMENTALES	47

4.1. Maceración.....	47
4.2. Módulo memHPLC.....	48
4.2.1. Ultrafiltración (UF)	48
4.2.2. Nanofiltración (NF) y Ósmosis Inversa (OI).....	52
4.3. Propuesta de tren de membranas con el módulo memHPLC	52
4.3.1. Lías de vino.....	52
4.3.2. Orujo de aceite	55
4.4. Planta plana con membranas de nanofiltración.....	58
ANÁLISIS DEL IMPACTO AMBIENTAL	63
CONCLUSIONES	65
ANÁLISIS ECONÓMICO	66
Coste del material de laboratorio utilizado.....	66
Coste energético	69
Coste personal.....	70
Coste total del proyecto	70
BIBLIOGRAFÍA	72
ANEXO A	77
A1. Características de otras membranas de nanofiltración y ósmosis inversa	77
A2. Resultados previos de nanofiltración y ósmosis inversa	77

1. Introducción

1.1. Objetivos del trabajo

El objetivo principal de este trabajo consiste en la revalorización de residuos agroalimentarios de la industria del vino (e.g., lías de vino) y del aceite de oliva (e.g., orujo de aceite) mediante la extracción de compuestos de valor añadido, como son los polifenoles, para su posterior tratamiento (separación y/o concentración) con diferentes tecnologías de membranas. Para ello se definen los siguientes sub-objetivos:

- Extracción de los polifenoles de las lías de vino y del orujo de aceite utilizando la técnica de maceración.
- Separación y/o concentración de los polifenoles mediante procesos de ultrafiltración (UF).
- Desarrollo de un tren de membranas (UF, nanofiltración (NF), y ósmosis inversa (OI)) para el tratamiento secuencial de los polifenoles a escala de laboratorio (113 cm²).
- Escalado del proceso de membranas con una planta plana (140 cm²) y dos membranas de nanofiltración (DURACID y NF90) con el extracto de lías de vino.

1.2. Alcance del proyecto

En este proyecto se extraen los polifenoles de las matrices del orujo de aceite y las lías de vino mediante la técnica de la maceración que resulta ser la óptima para estos sub-productos agroalimentarios. Esta técnica supone un método sencillo, rápido y económico con el que obtener los compuestos de interés. Para el proceso de maceración se utiliza agua Milli-Q como disolvente y las condiciones experimentales empleadas son las siguientes: la temperatura, 70°C para las lías de vino y 25°C para el orujo de aceite, el tiempo de extracción es de 10 minutos en ambas matrices, la velocidad de agitación se mantiene siempre constante a 350 rpm y finalmente la relación entre el residuo y el agua es de 1:100 g/mL para las lías de vino y de 1:30 g/mL para el orujo de aceite. Para la realización de éste proyecto no se han estudiado otras variables de influencia como son las extracciones sucesivas o las velocidades de mezcla.

En cuanto a las técnicas de membranas se estudian diferentes membranas de ultrafiltración (filtros en formato de disco de 30kDa y 50kDa), nanofiltración (DURACID, NF90 y NF270) y de osmosis inversa (BW30LE). Todas las membranas estudiadas utilizan la presión como fuerza impulsora para realizar la separación de la muestra. En primer lugar se emplea el equipo memHPLC con un área de membrana de 113 cm² y a continuación se extrapola a un módulo plano (con un área de membrana de 140 cm²)

para estudiar la influencia de la presión en el tratamiento del extracto de lías de vino con las membranas DURACID y NF90. Se estudia el comportamiento en las presiones trans-membrana (TMP) siguientes (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 i 22 bares) manteniendo constante el caudal de disolución a través del sistema. A lo largo de estos procesos no se ha llevado a cabo un estudio de la influencia de la temperatura en la separación y/o concentración de los polifenoles.

2. Estado del arte

Debido a la situación medioambiental actual cada vez son más las empresas que dedican su tiempo y recursos a minimizar los residuos generados, ya sea optimizando sus procesos de producción o bien revalorizando y reutilizando estos residuos al final del proceso. En el caso de la industria del vino y del aceite se generan enormes cantidades de residuos sólidos durante el proceso productivo, en el caso de la producción de vino se genera un 20% de residuos sólidos según la Organización Internacional del Vino (OIV), en el caso de la producción de aceite de oliva, por cada tonelada de aceitunas se generan 500 kg de orujo de aceite (1). Estos residuos contienen polifenoles, los cuales se pueden recuperar y concentrar utilizando diferentes técnicas de extracción y de tratamiento con membranas. De esta manera se consigue revalorizar los sub-productos obtenidos en el procesado de las industrias agroalimentarias como un producto con alto interés por parte de la comunidad científica debido a su beneficio en la salud y su capacidad antioxidante.(2)

2.1. Economía circular

La alternativa al modelo económico lineal actual es la economía circular, que pretende minimizar la producción de residuos, reutilizando, reciclando o transformando los productos obsoletos en nuevos bienes para los demás. De esta manera se consiguen cerrar los ciclos de producción, reduciendo drásticamente la cantidad de residuos generados, el desaprovechamiento de materias primas y la emisión de gases contaminantes.(3)

El crecimiento de la población mundial supone un reto para la economía lineal, la cual está llegando a su límite, siendo insostenible a largo plazo. Las necesidades de materia prima y de energía actual para sostener la producción de la industria global son inalcanzables para el planeta, así como la capacidad para absorber los residuos generados por esta. Así pues la idea de economía circular supone una forma viable en la que centrar los esfuerzos económicos y de infraestructura para de esta manera transformar los corrientes de salida de la industria en residuos orgánicos renovables o en productos listos para ser tratados, revalorizados y reutilizados para volver a entrar en el ciclo de producción.(4)

En la Figura 1 podemos ver un diagrama del modelo de economía circular publicado por Walter R. Stahel (3), gracias a su forma circular da una mayor comprensión de cómo y dónde reutilizar los residuos para la producción de nuevos productos de interés. La innovación y el desarrollo de nuevas tecnologías permiten repararlos y reutilizarlos para prolongar su uso, extraer productos de interés y reciclar los bienes usados, reduciendo la cantidad de recursos utilizados para la fabricación de nuevos productos.

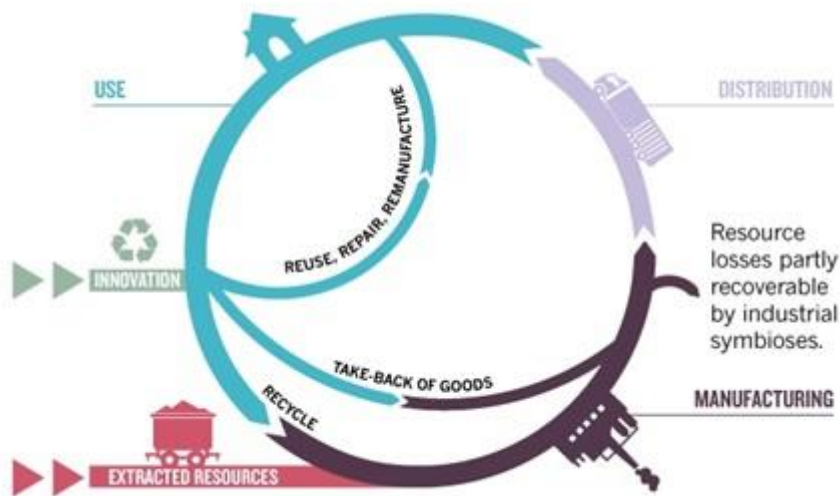


Figura 1. Esquema economía circular.(3)

2.2. Polifenoles

Los polifenoles son un grupo de sustancias químicas con un gran poder antioxidante debido a la presencia de más de un grupo fenólico en su estructura. Estas sustancias se encuentran de forma natural en la mayoría de frutas y verduras.(5)

En los últimos años este grupo de sustancias ha despertado un gran interés, debido a que se ha demostrado su gran impacto positivo en la salud, su capacidad antioxidante actúan previniendo la formación de radicales libres en los procesos de auto-oxidación (6). Su consumo a largo plazo puede actuar en el organismo protegiéndolo contra enfermedades coronarias (7), osteoporosis (8), diabetes (9), envejecimiento (10), desarrollo del cáncer (11) y enfermedades neurodegenerativas (12).

Según su estructura, los polifenoles se clasifican en cuatro clases: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbanos y lignandos, como se puede ver en la figura 2. La estructura de estas sustancias determinará sus características así como su capacidad antioxidante.

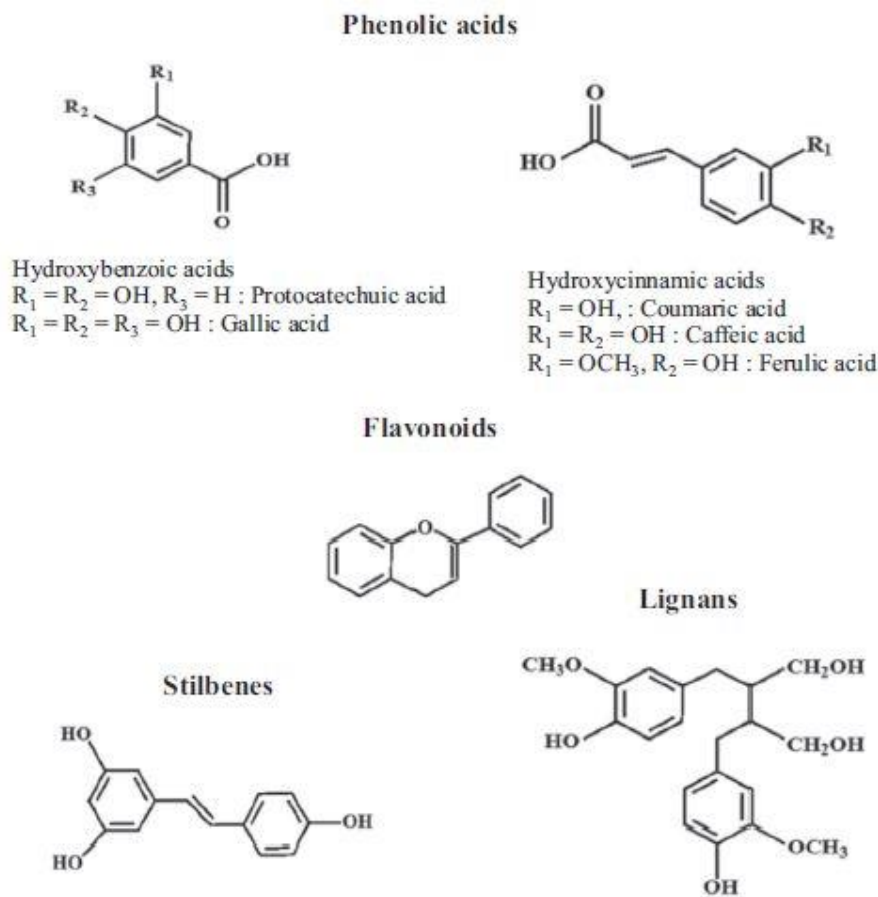


Figura 2. Estructura de los polifenoles.(2)

Los ácidos fenólicos se pueden separar en dos categorías, los derivados de ácidos hidroxibenzoicos y los derivados de ácidos hidroxicinámicos, con una estructura basada en C1-C6 y C3-C6, respectivamente.(2)

La mayoría de polifenoles presentes en frutas y verduras forman parte de la familia de los flavonoides (6), estos presentan una estructura de bajo peso molecular formada por dos anillos aromáticos unidos a un heterociclo oxigenado mediante la unión de tres átomos de carbono. En función del heterociclo se pueden distinguir seis clases diferentes: flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas y flavanoles.(2)

El representante principal de la familia de los estilbenos es el resveratrol, el cual podemos encontrar en más de 70 especies de plantas, algunas de ellas son las uvas, cacahuetes o frutas del bosque (2). Esta clase de polifenoles se encuentran en bajas cantidades en la dieta humana.(2)

Por último, los lignanos se producen por medio de la dimerización oxidativa de dos moléculas de propilbenceno (2). Estos compuestos además han demostrado tener un efecto positivo en varias aplicaciones farmacológicas, así como para el tratamiento con quimioterapia.(13)

2.3. Residuos de la producción de vino y aceite

La uva es uno de los principales cultivos de fruta en el mundo, produciendo a nivel mundial unos 78 millones de toneladas de esta fruta, en el año 2019 según la OIV (14). Teniendo en cuenta que el 75% de la producción de uva se utiliza para hacer vino, produciéndose anualmente 29200 millones de litros según los datos de la OIV en 2019, y el 25% del peso de la uva son la piel, semillas y el tallo. Francia, España e Italia, principales productores de vino, generan una cantidad de orujo de vino de 1200 toneladas al año cada una.(15)

Años atrás los residuos de la producción de vino eran simplemente eliminados pagando una tasa de eliminación, pero actualmente, esta tasa es muy costosa, lo que obliga a las empresas a enfocar sus esfuerzos de investigación y tecnología a la recuperación y revalorización de los residuos generados. Con los residuos de la industria del vino se pueden extraer varios productos de interés como son el ácido láctico, xilitol, etanol, ácido tartárico o los polifenoles.(16)

Existen diferentes procesos de producción según las características del producto final a obtener, como el vino blanco, negro o rosado. Una vez recogida la uva del viñedo, esta se prensa para obtener el mosto. El mosto es fermentado, y dependiendo de las características que se quieran obtener, se fermenta con pieles y semillas o no. En el caso de llevar a cabo la fermentación con pieles y semillas, se realiza una decantación para separar el residuo sólido del líquido, obteniendo dos corrientes, uno de vino sin clarificar (fase líquida) y otro de orujo de uva (sólido). Después se lleva a cabo una segunda fermentación, llamada maloláctica, para transformar el ácido málico en ácido láctico, así se consigue suavizar el vino ya que el primero de los ácidos es un ácido fuerte, al contrario del segundo. Alternativamente a la fermentación maloláctica, se puede clarificar el vino. Finalmente se filtra y se embotella. En la Figura 3 se representa esquemáticamente el proceso.

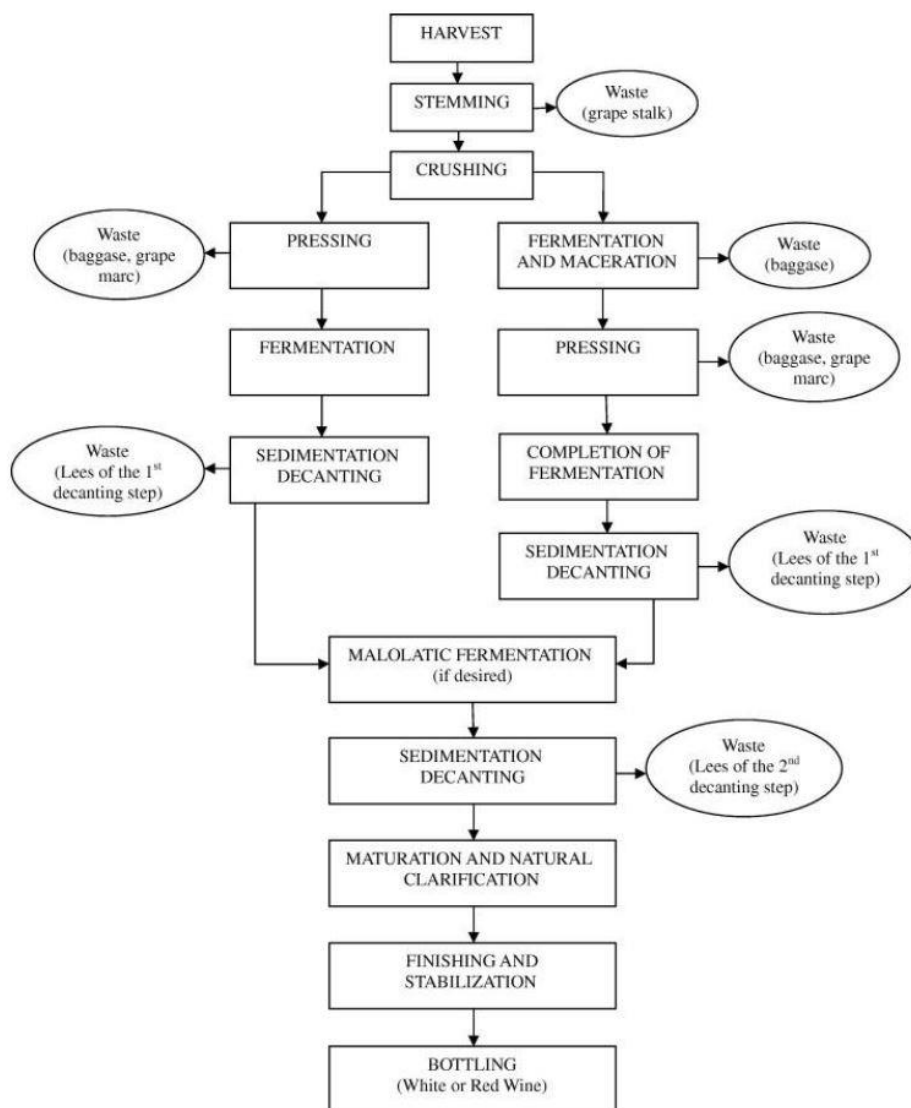


Figura 3. Producción del vino.(16)

Los dos principales residuos generados son el orujo y las lías de vino. El primero se genera durante la producción del mosto, consistiendo en una mezcla de las pieles, semillas y las uvas prensadas. Por su composición, estos residuos se utilizan para la extracción de polifenoles y aceite de las semillas, aunque también se utilizan en otros procesos como son la producción de ácido nítrico, metanol, etanol y xantana mediante procesos de fermentación. Las lías de vino en cambio se forman en los posos de los tanques de almacenamiento del vino, después de su fermentación, o también durante la filtración o centrifugación del vino. Se componen principalmente por biomasa microbiana, ácido tartárico, metales, compuestos fenólicos y residuos sólidos de la uva, son de gran interés ya que interactúan con los polifenoles, absorbiéndolos y modificando el color y las condiciones organolépticas del vino.(17)

El aceite de oliva es uno de los aceites comestibles más consumidos mundialmente, con una producción anual europea de aproximadamente 2,5 millones de toneladas métricas al año, siendo

Europa el principal productor a nivel mundial con más del 98% de la producción mundial. España, Italia, Grecia y Portugal son los países con mayor volumen productivo actualmente, aunque en los últimos años se ha promocionado la producción de aceite de oliva en varios países como Argentina, Australia, los Estados Unidos de América o Sud África. A nivel global, la producción de aceite de oliva, se ha incrementado en un 40% durante los últimos 10 años.(18)

Los residuos generados por esta industria son realmente peligrosos y perjudiciales para el medio ambiente, ya que tienen una carga orgánica toxica muy elevada, con un pH bajo alrededor de 5,3 y alta demanda química de oxígeno de 108 g/L y biológica de 41 g/L. Por tanto, resulta vital el reaprovechamiento y la revaloración de estos residuos, ya que se pueden extraer compuestos fenólicos, fibras alimentarias, biocombustible, biogás, enzimas, polímeros y otros compuestos de interés.(18)

Existen dos procesos, uno continuo (prensado) y otro discontinuo (centrifugado) para la producción del aceite de oliva.

El proceso continuo es el más moderno y se puede realizar en dos o tres fases. Primero se limpia la oliva, se separan las hojas, arena y otros residuos. Después se muele la aceituna entera y se mezcla la pasta obtenida. Se prensa el producto obtenido, generando dos corrientes, uno de aceite líquido y otro de residuo sólido, los cuales son separados mediante una o dos fases de centrifugación. La primera fase de centrifugación será horizontal, aunque en el caso de necesitarse dos fases de centrifugación la segunda será una centrifugación vertical. Con una sola fase de centrifugación se consigue reducir los residuos líquidos obtenidos, utilizando centrifugadoras horizontales que funcionan sin la necesidad de añadir agua caliente en el proceso.

El proceso tradicional de producción de aceite de oliva es el discontinuo, al igual que el proceso anterior primero se lava la oliva, se separan las hojas y otras impurezas, se muele la oliva entera, se prensa y se realiza la separación de la fase líquida de la sólida mediante un proceso de decantación.

En la Figura 4 se ven resumidas las diferentes fases del proceso de producción de aceite de oliva.

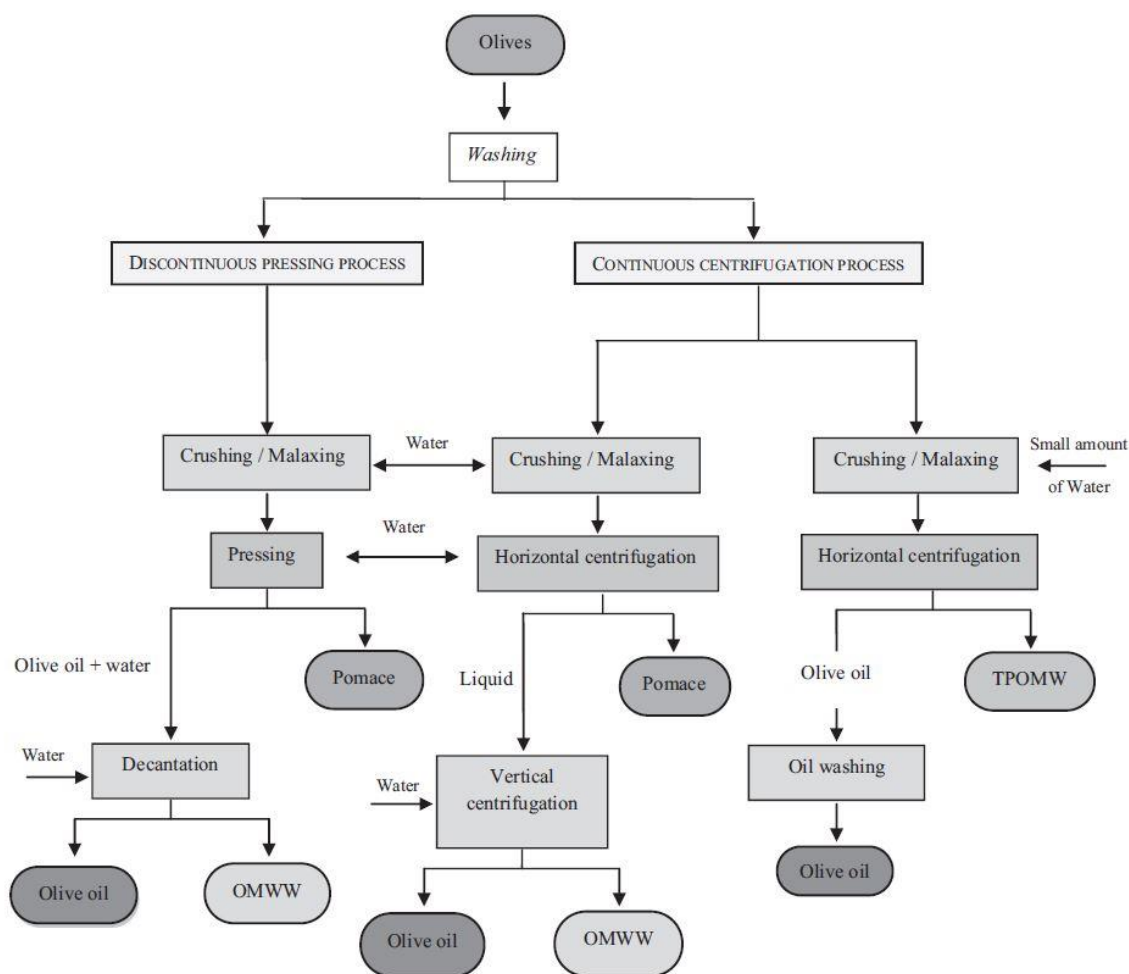


Figura 4. Esquema del proceso de producción de aceite de oliva.(18)

Igual que en el caso del vino, durante la producción del aceite de oliva se generan mayormente dos residuos diferentes, el orujo o alperujo de aceite y el alpechín. El primero es un residuo sólido y muy grasiento que se genera durante el proceso de prensado, por tanto, está compuesto por las pieles, la pulpa y el hueso de la aceituna, y es rico en polisacáridos, proteínas, ácidos grasos, polifenoles y pigmentos. En cambio, el segundo residuo es líquido, se genera en todas las fases en las que se añade agua a la producción, como sería el lavado de la aceituna, durante el proceso de centrifugación o decantación, y es rico en polifenoles, polialcoholes, lípidos, azúcares y pectinas.

2.4. Extracción de polifenoles

El proceso de extracción es fundamental para conseguir separar los componentes de interés de una matriz (19), este proceso se lleva a cabo introduciendo un disolvente a través de la matriz sólida. Este

disolvente capta el producto a extraer, el soluto, y finalmente se obtiene un corriente de disolvente rico en el soluto de la matriz.(20)

Estas técnicas han sido utilizadas a lo largo del tiempo en diferentes ámbitos, dividiendo estas técnicas en convencionales y modernas. Las técnicas convencionales destacan por su simpleza y facilidad de realización, por otro lado, se han perfeccionado técnicas con una mayor complejidad tecnológica que permiten realizar extracciones más complicadas o con mayor efectividad.(20)

Las principales técnicas de extracción convencional son las siguientes:

- **Maceración:** esta técnica de extracción consiste en sumergir la matriz sólida en el disolvente escogido, normalmente se utiliza agua, y esperar un tiempo hasta que los componentes solubles de la matriz se disuelvan en el líquido. Este proceso se puede favorecer mediante la agitación o la aplicación de calor. Resulta una técnica simple, con una eficacia limitada y con la desventaja de tener tiempos de extracción elevados.(20)
- **Percolación:** este método se basa en el mismo principio que la maceración, se diferencia en que en la percolación se utiliza un tubo cilíndrico, dentro del cual se ubica la matriz sólida, y mediante dos aberturas en la base y la parte superior del cilindro se hace fluir el disolvente, recogiendo el extracto en la parte inferior, por tanto se trata de un proceso continuo.(20)
- **Extracción con reflujo:** con este proceso se obtienen mejores resultados que con los dos anteriores, además utiliza menos tiempo de extracción y necesita menos solvente. Es un método parecido a la percolación, pero con un sistema de reflujo que permite recuperar el disolvente y calentar el sistema para obtener una mayor eficacia en la extracción. Un ejemplo de la aplicación de este proceso es el extractor *Soxhlet*.(20)

Por otro lado, las principales técnicas modernas de extracción son las siguientes:

- **Extracción con fluido supercrítico:** esta técnica utiliza los fluidos supercríticos, esos que se encuentran por encima de su punto crítico, como disolventes para la extracción. Por su naturaleza éstos fluidos tienen una mayor difusividad a través de la matriz sólida, además de una mayor capacidad de disolver productos en ellos.(20)
- **Extracción con líquido presurizado:** mediante la presurización de la mezcla de la matriz sólida con el disolvente se consigue mantener este último en estado líquido a mayores temperaturas, aumentando la solubilidad y la difusión hacia el disolvente.(20)
- **Extracción asistida por microondas:** mediante la energía de las microondas se genera calor por la interacción de los componentes polares de la mezcla, creando una conducción iónica y rotación de los dipolos, favoreciendo así la disolución de los componentes de la matriz sólida. Otra de las ventajas de este método es la reducción de la degradación térmica de la matriz.(20)

- **Extracción asistida por ultrasonidos:** gracias a la energía de los ultrasonidos, se acelera la disolución del soluto, así como la difusión de este y la transferencia de calor produciendo una extracción más eficiente. Otras ventajas de esta técnica es la disminución de la temperatura y el tiempo de extracción, así como la energía consumida durante el proceso.(20)

En la Tabla 1 se encuentran resumidas las extracciones explicadas y sus principales características.

Tabla 1. Resumen de las características de las técnicas de extracción.(20)

Método	Solvente	Temperatura	Presión	Tiempo	Volumen de solvente consumido	Polaridad de los productos naturales extraídos
Maceración	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Temperatura ambiente o con calor	Atmosférica	Largo	Elevado	Depende del solvente
Percolación	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Temperatura ambiente o con calor	Atmosférica	Largo	Elevado	Depende del solvente
Extracción con reflujo	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Con calor	Atmosférica	Moderado	Moderado	Depende del solvente
Extracción con fluido supercrítico	Fluido supercrítico, normalmente S-CO ₂	Aproximadamente a temperatura ambiente	Elevada	Corto	Poco o nulo	Componentes no polares hasta poco polares
Extracción con líquido presurizado	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Con calor	Elevada	Corto	Poco	Depende del solvente

Extracción asistida por microondas	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Temperatura ambiente	Atmosférica	Corto	Poco o moderado	Depende del solvente
Extracción asistida por ultrasonidos	Agua, otros solventes acuosos o no-acuosos	Temperatura ambiente o con calor	Atmosférica	Corto	Moderado	Depende del solvente

La maceración es la técnica utilizada en este trabajo, realizándola elevando la temperatura y con la ayuda de agitación para homogeneizar la mezcla y la distribución del calor, esto reduce los costes derivados de utilizar técnicas más modernas donde los equipos necesarios son muy caros.

Safdar et al. (21) compararon el método de extracción asistida por ultrasonidos con la técnica de maceración en pieles de mandarinas. Los resultados indicaban una mayor eficiencia de la técnica de extracción asistida por ultrasonidos (UAE por sus siglas en inglés) sobre la maceración, 32,5 mg de ácido gálico equivalente (GAE)/g de extracto por UAE en comparación a los 28,4 mg de GAE/g de extracto obtenidos mediante maceración. El disolvente con el que se han obtenido concentraciones más elevadas de polifenoles es el metanol al 80% para ambas técnicas. Las concentraciones más bajas de polifenoles se obtuvieron con acetato de etilo al 80% para la maceración (8,6 mg de GAE/g de extracto) y con etanol al 100% con la técnica de UAE (24,4 mg de GAE/g de extracto).

Ćujić et al. (22) realizaron un estudio dónde utilizaron la maceración como técnica tradicional de extracción para extraer polifenoles presentes en una fruta del bosque secada (*Aronia melanocarpa*). Tuvieron en cuenta diferentes variables como el solvente, tamaño de partícula, relación sólido-solvente y tiempo de extracción, en cambio, otras variables como la temperatura (temperatura ambiente) o la agitación (170 rpm) se dejaron fijas durante todo el estudio. Las condiciones óptimas de extracción consistieron en la maceración de aronias de 0,75 mm de tamaño, utilizando etanol al 50% como solvente y una relación sólido-solvente de 1:20 g/mL (el tiempo de extracción resultó no ser un factor relevante en la extracción). Después del análisis mediante el método HPLC se determinó que en las condiciones óptimas el extracto tenía una concentración de 27,8 mg de GAE/g de extracto.

Jovanović et al. (23) optimizaron la extracción de polifenoles presentes en la serpol (*Thymus serpyllum* L.), planta de la familia *Lamiaceae*, mediante maceración y técnicas asistidas por calor (HAE por sus siglas en inglés *Heat assisted extraction*) y ultrasonidos (UAE por sus siglas en inglés *Ultrasound assisted extraction*). Las variables estudiadas fueron: el tamaño de partícula, relación sólido-solvente, tipo de solvente y tiempo de extracción. La temperatura se mantuvo constante en todos los

experimentos a temperatura ambiente. Al igual que en el estudio realizado por Čujić et al. (22), el tiempo de extracción, estadísticamente, no resultó tener una influencia significativa a la cantidad de polifenoles extraídos. Las condiciones óptimas fueron de 0,3 mm de tamaño de partícula, relación sólido-solvente de 1:30 g/mL y etanol al 50% como solvente. En estas condiciones se obtuvieron unos extractos con concentraciones 26,6 mg de GAE/L con maceración, 29,8 mg de GAE/L con HAE y 32,7 mg de GAE/L con UAE, los extractos fueron analizados mediante el método HPLC.

2.5. Tecnología de membranas

Las tecnologías de membranas presentan una gran cantidad de ventajas sobre los métodos convencionales de separación como la decantación, las membranas permiten operar a menores temperaturas, en ausencia de transición de fase, con un equipamiento más sencillo y obteniendo una separación altamente eficiente con un consumo de energía muy bajo. Además su versatilidad permite la combinación de la tecnología de membranas con otros métodos de separación con el fin de mejorar y aumentar la eficacia de los procesos.(2)

Las membranas son superficies que dejan pasar unas sustancias o compuestos y otros no, es decir, actúan como una barrera selectiva frente a una corriente o un entorno. Las membranas se clasifican en dos grandes bloques, las biológicas, como por ejemplo la membrana celular presente en las células de los seres vivos, y las sintéticas, que consisten en las fabricadas por el ser humano para su uso en la industria y los laboratorios.(6)

En la Figura 5 se muestra la estructura esquemática, funcionamiento y corrientes de una membrana. La alimentación (A) es la corriente de entrada al sistema, el permeado (P) es la corriente compuesta por todas las sustancias que han logrado atravesar la membrana y el rechazo (R) se compone de todo lo que no ha conseguido atravesar la membrana.

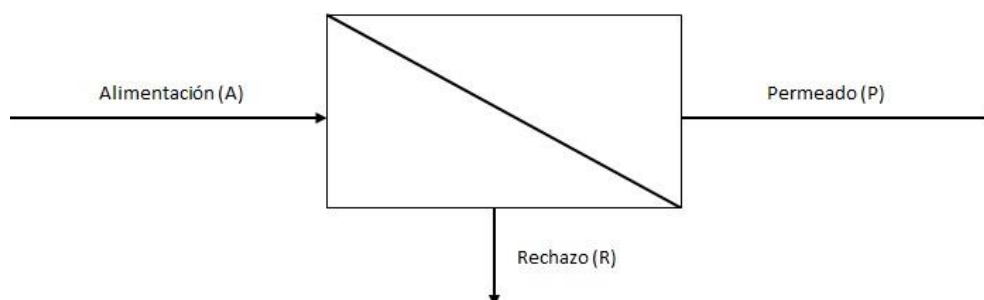


Figura 5. Esquema de un sistema de membrana.

Puesto que las membranas utilizadas para procesos industriales son las sintéticas, para la realización de este proyecto se han utilizado este tipo de membranas. Las membranas sintéticas pueden

distinguirse entre porosas, no porosas y líquidas. Dentro de estas tres categorías se pueden fabricar de muchos materiales diferentes, como por ejemplo de sólidos físicos (metales o cerámica), de sólidos heterogéneos (mezcla de cristales o polímeros), películas homogéneas (polímeros o metales), disoluciones (normalmente polímeros), líquidos o estructuras asimétricas.(6)

Existen varios tipos de configuración de membranas, las membranas planas, tubulares, de fibra hueca o en espiral son unas cuantas de las principales configuraciones. Las membranas planas son simples hojas o laminas planas, la superficie de membrana es reducida y para aumentarla hay que ponerlas unas encima de otras. Las membranas tubulares tienen forma de cilindro, y el flujo de permeado circula a través del tubo desde el interior al exterior. Las membranas de fibra hueca son similares a las anteriores, tienen forma de tubo capilar y el flujo de permeado circula del exterior al interior de este. Finalmente, las membranas en espiral consisten en una o varias laminas enrolladas, proporcionando una mayor superficie en menor espacio que las membranas planas.

Para conseguir la separación de la corriente de alimentación, las membranas utilizan la fuerza impulsora para conseguir que parte de la alimentación pase a través de la membrana. Según la naturaleza de la fuerza impulsora se aplican diferentes tecnologías de membranas. La fuerza impulsora puede ser la i) presión para procesos de: microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, osmosis inversa; ii) presión parcial para el permeado de gases; iii) la afinidad electrónica para procesos de: pervaporación, diálisis y membranas líquidas; iv) diferencia de temperatura para la destilación por membranas y la termo-osmosis; y finalmente, v) la diferencia de potencial, presente en el electrodialisis y los procesos eléctricos de membranas.(6)

Las membranas utilizadas para la concentración de polifenoles en este estudio utilizan la presión como fuerza impulsora, las membranas de NF y OI son densas, y se diferencian entre ellas por el tamaño de moléculas que separan, expresado en Daltons (Da), y no por el tamaño de los poros. En la Tabla 2 están representadas las diferentes membranas que utilizan la presión como fuerza impulsora, el tamaño de moléculas que separan y el rango de presión de trabajo, incluidas las tres categorías que se utilizan en este trabajo, las membranas de UF, NF y de OI.

Tabla 2. Tipo de membrana que utiliza la presión como fuerza impulsora y sus principales características.

Tipo de membrana	Tamaño de la molécula que separa (Da)	Presión de trabajo (bar)
Microfiltración (MF)	>100,000	1-5
Ultrafiltración (UF)	1,000-100,000	1-10
Nanofiltración (NF)	100-1,000	10-30

Osmosis inversa (OI)	1-100	35-100
----------------------	-------	--------

2.5.1. Ultrafiltración

Las membranas de UF, en un principio, son un mecanismo que permite separar componentes específicos mediante el tamaño de los poros de la membrana, sin embargo, este no es el único criterio durante la separación, otros fenómenos (concentración por polarización, interacciones hidrofóbicas, ensuciamiento de la membrana, etc) ocurren e influyen en la separación de los compuestos fenólicos.(24)

Giacobbo et al. (25) realizaron un estudio con membranas de UF poliméricas para la recuperación de polifenoles y polisacáridos en residuos generados en la industria del vino, en concreto las aguas residuales de la producción de vino tinto. Se utilizaron dos membranas de tamaño de poro de 1 kDa y 10 kDa (ETNA 01PP y ETNA10PP, respectivamente) en un módulo de membranas con área efectiva de 14,5 cm² y temperatura de alimentación de 25°C. Se obtuvieron unos porcentajes de rechazo menores en el caso de la membrana de 10 kDa, trabajando a 15 bares de TMP el rechazo de polifenoles era del 50%, mientras que con la membrana de 1 kDa el rechazo era del 60%. Dentro del rango de TMP de estudio, entre 3 y 15 bares, el porcentaje de rechazo aumentaba al elevar la presión debido a la formación de una capa selectiva adicional formada en la superficie de la membrana. Sin embargo, se produce el efecto contrario con un extracto obtenido de la destilación del orujo de vino fermentado.

Conidi et al. (26) aplicaron la tecnología de membranas de ultrafiltración plana, con membranas de tamaño de poro entre los 1000 Da hasta 4000 Da (Etna 01 PP, PES004, MPF-36 y Desal GK), equipadas en un módulo de membranas Sepa CFII de 140 cm². Concentraron los polifenoles procedentes del zumo de granada a temperatura ambiente (25°C) y una TMP de 15 bares. Los valores más elevados de rechazo de polifenoles totales se consiguieron con la membrana MPF-36 de 1000 Da, siendo del 97,5%, seguidos de la membrana PES004 de 4000 Da, con un rechazo total de 95% de los polifenoles totales.

Cissé et al. (27) realizaron un estudio para evaluar el rendimiento de una serie de membranas de UF plana en el tratamiento de extracto de roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). Utilizaron un módulo de membranas con un área efectiva de 155 cm² y las siguientes membranas: GH (1 kDa), GK (2 kDa) y GE (1 kDa) de la empresa GE Osmotics y, por otro lado, las membranas UP005 (5 kDa), UP020 (20 kDa), UH030 (30 kDa), UH050 (50 kDa) y UP150 (150 kDa) de la empresa Microdyn-Nadir. Para todas las membranas testadas, se observó como un aumento en la TMP se traduce en un aumento de la concentración de antocianina (familia de los flavonoides). Además, los porcentajes de rechazo van desde un 24% con la membrana de 150 kDa a 5 bares de TMP, hasta un 97% con la membrana de 5 kDa a 30 bares de TMP. También se observó como las membranas con mayor tamaño de poro eran más sensibles a los cambios de operación, puesto que las membranas de 150 kDa presentaban valores

de rechazo entre el 28% y 62% entre 10 y 30 bares de TMP, mientras que en el mismo rango de presiones una membrana de 5kDa presentaba rechazos entre el 93% y 97%.

2.5.2. Nanofiltración y osmosis inversa

Hay diferentes estudios en dónde se muestra que es posible concentrar una corriente rica en polifenoles mediante la aplicación de tecnologías de membranas de nanofiltración y osmosis inversa. Este tipo de membranas no solo separan los componentes fenólicos por su tamaño, sino que bajo las condiciones adecuadas de pH pueden ser absorbidos fácilmente por este tipo de membranas hidrofóbicas provocando un efecto llamado *fouling* o ensuciamiento de la membrana, pudiendo producir un descenso del flujo a través de la membrana así como afectar al buen funcionamiento de esta.(2)

Avram et al. (28) estudiaron cómo concentrar los polifenoles extraídos de la pulpa de arándanos mediante nanofiltración. Realizaron los experimentos en dos módulos diferentes, uno de filtración a contra corriente (42 cm² de área activa, a 23°C con una TMP de 3 bares) y otra filtración *dead-end* (14,6 cm² de área activa, a 23°C y con una TMP entre 10 y 17 bares). Utilizaron dos membranas planas de poliamida, NF245 y NF270. Ambas membranas presentaron un rechazo total de polifenoles en ambas configuraciones, aunque en la membrana NF245 se encontraron más polifenoles en la corriente de rechazo. El rechazo final de polifenoles fue cercano al 100% teniendo en cuenta los límites de detección independientemente de los parámetros estudiados (velocidad de mezcla del extracto (0, 200 y 400 rpm), etapa de prefiltración (ninguna, 0,22 µm y 0,44 µm) y tiempo de filtración (1, 19 y 29h))

Magalhães et al. (29) realizaron un estudio con membranas de MF (tamaño de poro de 0,22 µm), UF (membrana de polietersulfona de 5 kDa del fabricante Microdyn-Nadir) y NF (membrana de polipropileno de 500-600 Da del fabricante Microdyn-Nadir) para la recuperación de polifenoles presentes en una fruta típica en Brasil (*Caryocar brasiliense* Camb.). Los experimentos de NF se realizaron a 8 bares de TMP, en un módulo con área efectiva de 19,3 cm² y a temperatura ambiente (25°C). En estas condiciones, la membrana de NF produjo unos porcentajes de rechazo de aproximadamente el 72% de polifenoles totales, 87% de ácido gálico (familia de los HB), 90% de ácido elágico y 92% de ácido p-cumárico (familia de los HC).

Giacobbo et al. (25) estudiaron la concentración y polarización de los polifenoles presentes en una corriente de aguas residuales de la producción del vino tinto mediante nanofiltración, con la membrana NF270, en un módulo de membranas con área efectiva de 14,5 cm² y temperatura de alimentación de 25°C. El rechazo de polifenoles aumentó al aumentar la TMP, siendo de 91.3% a 3 bares y de 94,7% a 15 bares. También se observó cómo un aumento en la velocidad de la corriente no afecta significativamente a la concentración de polifenoles en el rechazo ya que se realizó el experimento entre 3 y 15 bares de TMP a diferentes velocidades (0,48, 0,72 y 0,96 m/s) y en todas ellas

se obtuvieron valores parecido de concentración en el permeado, únicamente varían en función de la TMP; por ejemplo, a 3 bares de presión la concentración de polifenoles en el permeado es de 31,3, 31,6 y 30,9 mg/L a las tres velocidades de corriente mencionadas respectivamente.

Ioannou et al. (30) realizaron un estudio en una planta de osmosis inversa para la purificación de aguas residuales de la producción del vino. Para el tratamiento de los residuos se utilizó la membrana AG2521Tf Desal en un módulo de membranas de área efectiva 1,2 m² a temperatura ambiente (26°C). Los extractos se analizaron mediante el método HPLC. Los resultados obtenidos muestran un rechazo prácticamente completo (99,3%) de la concentración de polifenoles totales. También se estudió el rechazo de 5 polifenoles de manera individual (ácido gálico, ácido vanílico, catequina, ácido p-cumárico y ácido ferúlico) obteniéndose unos porcentajes de rechazo de 100%, 100%, 99,1%, 98,7% y 98,7% respectivamente.

Gunathilake et al. (31) utilizaron la membrana de OI BW30-2540, con área efectiva de 2,6 m², para realizar un estudio en zumos de frutas (manzana, arándanos y arándanos rojos) para mejorar sus capacidades antioxidantes aumentando la concentración de compuestos como los polifenoles. Los experimentos estudiaron el efecto de la temperatura de la muestra (20 y 40°C) y la TMP (25, 30 y 35 bares). Las condiciones óptimas de operación fueron de 40°C y 35 bares de TMP, bajo estas condiciones las concentraciones totales de polifenoles pasaron de 578, 4704 y 4830 mg/L en manzanas, arándanos y arándanos rojos respectivamente, a 801, 6279 y 6279 mg/L.

2.6. Otros métodos de separación y/o concentración de polifenoles

2.6.1. Tratamiento con resinas

Las resinas poliméricas son polímeros porosos y sintéticos con una superficie interna muy elevada, usadas principalmente en procesos de adsorción líquida. Las resinas tienen una alta estabilidad mecánica y química en valores altos de pH. Tienen la capacidad de adsorber hidrocarburos clorados o aromáticos, fenoles y pesticidas de aguas residuales. Las características de las resinas permiten su aplicación en la industria alimentaria y farmacéutica para la purificación de vitaminas, antibióticos y productos alimentarios. En la Figura 6 se puede observar de forma esquemática la primera fase de adsorción de las resinas, donde se capta el compuesto de interés, la siguiente fase consiste en una desorción, donde mediante una disolución se separa el compuesto de la resina. (32)

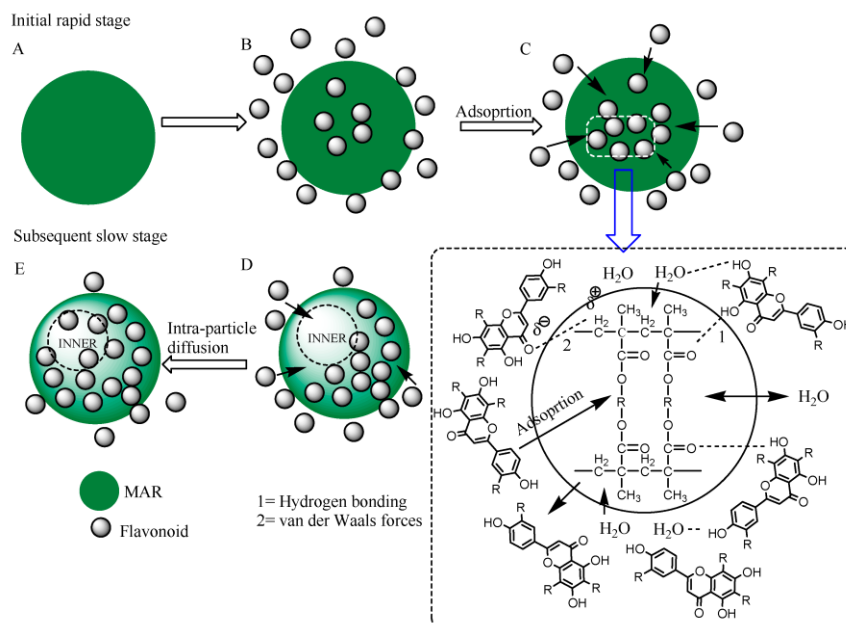


Figura 6. Esquema del proceso de adsorción de las resinas. (33)

Ortega et al. (34) realizaron un estudio para la recuperación de ácido gálico (polifenol de la familia de los hidroxibenzoicos) mediante una resina de intercambio iónico Dowex 21K XLT. En este estudio se evaluaron el tiempo (0 a 120 minutos), la concentración inicial de ácido gálico (10 hasta 1000 mg/L) y se realizaron los experimentos a temperatura ambiente (25°C) con un volumen de muestra de 100 mL. Se observa que el incremento en el tiempo de contacto entre la resina y la muestra, aumenta la adsorción de los polifenoles, estabilizándose la recuperación de polifenoles a partir de los 60 minutos, en un porcentaje del 82%. Además, se mostró una fuerte dependencia de la capacidad de adsorción frente a la cantidad inicial del polifenol. La resina utilizada en este estudio proporcionó una capacidad de adsorción de 263,2 mg ácido gálico/g resina. Esta capacidad es más elevada que la obtenida por Caetano et al. (35) con la resina Aurix 100 (75,8 mg/g) o Dowex XZ (76,8 mg/g) en un estudio similar, en un rango de concentración de polifenoles iniciales de 5 hasta 2000 mg/L, a temperatura ambiente (21°C) y con un volumen de muestra de 20 mL. Finalmente, la resina Dowex 21K XLT, consigue obtener una recuperación de alrededor del 100% de ácido gálico pasados los 120 minutos de ensayo.

Zhu et al. (36) estudiaron la recuperación de polifenoles de la familia de los flavonoides en aguas residuales de la producción de nueces mediante resinas macroporosas (AB-8, NAK-9, HPD-100, D101 y X-5). Las condiciones óptimas de adsorción resultaron ser: concentración de la muestra inicial de 0,34 mg/mL, pH 7, 25°C, relación volumen de muestra-volumen del lecho (BV por sus siglas en inglés *Bed volumen*) 1:2,67, caudal del extracto de 2 BV/h. El proceso de adsorción se llevó a cabo a 25°C, con una agitación a 120rpm durante 24 horas, hasta llegar al equilibrio de adsorción, seguidamente las resinas se lavaron con agua destilada y entonces se llevó a cabo el proceso de desorción con 100 mL de etanol al 80% (a 25°C, con agitación a 120rpm durante 12 horas). La resina que presentó mejores resultados

es la AB-8, llegando a una capacidad de adsorción de 7,5 mg de flavonoides/g de resina tras 4 horas; a partir de las 4 horas la capacidad de adsorción se mantiene estable. La condición óptima de pH para la resina AB-8 es pH 7, al aumentar el pH, disminuye la capacidad de adsorción de la resina y viceversa, esto puede indicar que a elevados niveles de pH, los grupos hidrogenados de los flavonoides se disocian en hidrogeno y sus correspondientes aniones, reduciendo la capacidad de adsorción de las resinas. El porcentaje de recuperación de flavonoides obtenido en las condiciones óptimas de trabajo comentadas anteriormente por la resina AB-8 es del 81,73%.

Zagklis et al. (37) realizaron la purificación de compuestos fenólicos presentes en las lías de vino a través de un proceso de extracción con solvente, filtración con membranas de UF y NF y finalmente un tratamiento con resinas no iónicas (XAD4, XAD16N y XAD7HP). Las resinas XAD16N y XAD7HP consiguen una adsorción de polifenoles de aproximadamente el 95% a partir de los 60 g de resina/L de extracto, en cambio, la resina XAD4 necesita 80 g de resina/L de extracto para adsorber el 95% de los polifenoles totales. A pesar de obtenerse valores de adsorción similares para las tres resinas, la resina XAD16N obtiene una mayor adsorción de carbohidratos, un 40% a 180 g de resina/L, mientras que la resina XAD4 obtiene un 37% y la XAD7HP un 35% a la misma concentración. La concentración final obtenida, después de los procesos de extracción, UF, NF y tratamiento con la resina XAD16N es de 190 g/L de polifenoles expresados como equivalentes de ácido gálico, comparado con los 0,44 g/L que presentaba la muestra inicial.

Agalias et al. (38) estudiaron un proceso para el tratamiento de aguas residuales de la producción del aceite de oliva. El proceso se divide en tres fases, la primera es una MF para eliminar partículas en suspensión hasta 25 μm , seguido de un tratamiento con las resinas XAD4, XAD16 y XAD7HP para la recuperación de polifenoles y finalmente una evaporación térmica. Las resinas se extrajeron con acetona durante 8 horas y entonces se secaron durante 2 horas en el vacío a 24°C, como forma de pretratamiento. Se realizaron experimentos con una concentración inicial entre 200 y 1000 mg/L de hydroxytyrosol, el tiempo de adsorción fue de 24 horas hasta llegar al equilibrio de adsorción a temperatura ambiente. Con todas las resinas se obtuvieron unos porcentajes de recuperación de polifenoles del 99,99% pasadas 24h, aunque a partir de los primeros 60 minutos, el porcentaje de recuperación de polifenoles más elevado era con la membrana XAD16, un 95%.

Savarese et al. (39) también estudiaron el tratamiento de aguas residuales de la producción del aceite de oliva, mediante tecnología de membranas y resinas adsorbentes (Macronet MN-202) en una planta piloto con una capacidad de tratamiento de 1 m³/h. Antes de tratar las aguas residuales con las resinas adsorbentes, pasan por una serie de etapas de filtración con membranas (UF, NF y OI) con el fin de obtener un corriente rico en polifenoles. De las etapas de filtración se obtiene un corriente rico en polifenoles (permeado de la fase de NF con concentración 4194 mg/kg y un volumen de 150 L) que se trata mediante la resina Macronet MN-202 (con un área superficial específica de 800-1100 m²/g) para

concentrar y purificar estos componentes. La corriente pasa por tres fases durante el tratamiento con resinas: adsorción, desorción y regeneración. Durante la adsorción la corriente, con caudal igual a 3 BV/h (1 BV es igual a 1 litro de alimentación por litro de resina) pasa a través de una columna dónde la resina adsorbe los polifenoles. Durante la desorción se pasa un solvente, en este caso etanol (75L), a través de la columna, con un caudal de 1,5 BV/h, para recuperar los polifenoles de la resina. Luego el etanol es evaporado para recuperar el contenido de polifenoles. Finalmente, la fase de regeneración sirve para regenerar la resina mediante una solución acuosa de hidróxido de sodio al 2% w/v, esta solución se suministra en equicorrente con un caudal de 3 BV/h. Los cromatogramas obtenidos al analizar la composición final del extracto evaporado mediante un equipo HPLC, muestran como existe una alta recuperación de los polifenoles, 3 veces más elevada que la obtenida mediante el tratamiento con membranas. El producto final es de textura cremosa, con un contenido en polifenoles del 9,5%, un tercio del cual es hidroxitirosol, y se han obtenido hasta 27 kg de este producto por cada 10 m³ de aguas residuales tratadas.

2.6.2. Tratamiento de cromatografía extractiva

La cromatografía es una de las técnicas más eficaces para la separación de compuestos y se basa en las diferentes constantes de equilibrio de los compuestos situados en un sistema bifásico. Existe una fase móvil que se filtra a través de otra fase estacionaria a lo largo de una columna cromatográfica. La fase móvil se encarga de transportar los diferentes componentes de la muestra a través de la columna, y estos componentes se desplazan a velocidades diferentes dependiendo de la velocidad de la fase móvil y la constante de equilibrio del compuesto. Finalmente, los compuestos con mayor afinidad hacia la fase móvil obtendrán tiempos de residencia en la columna menores que los compuestos afines a la fase estacionaria. En la Figura 7 se puede observar el funcionamiento de esta técnica de manera esquemática.(32)

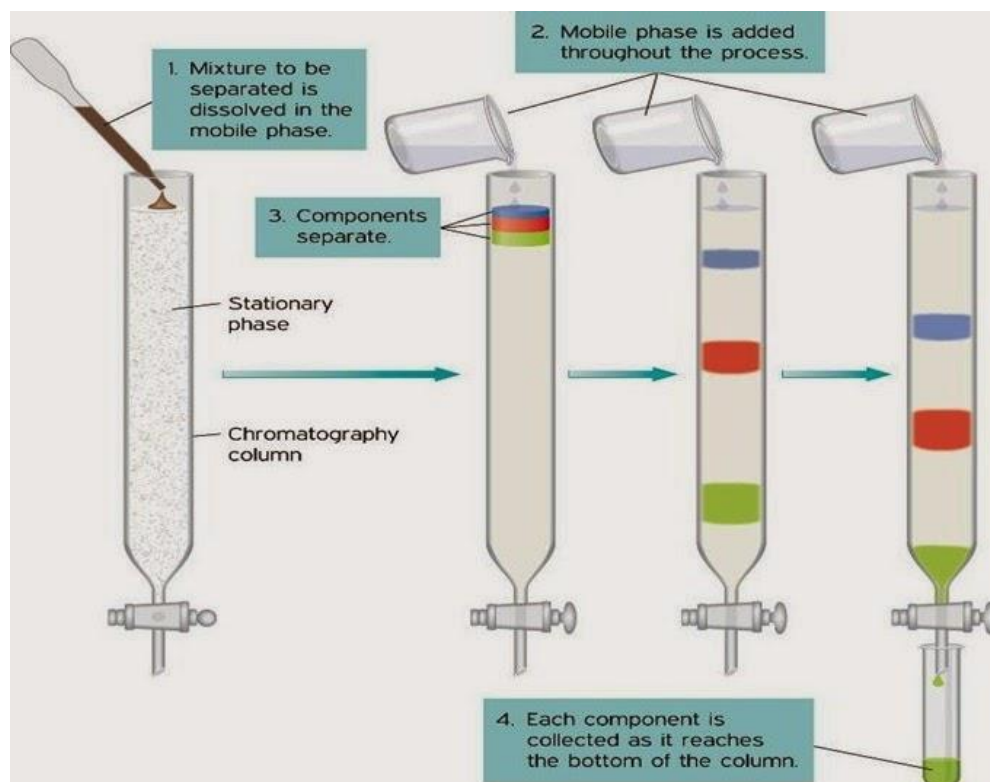


Figura 7. Esquema de funcionamiento cromatografía extractiva.(40)

Habitualmente, esta técnica, se utiliza de manera analítica para separar los compuestos de una muestra y detectarlos e identificarlos *online*, aunque existe la posibilidad de aplicarla para la separación y posterior recuperación de los compuestos purificados.(32)

Empresas internacionales como Novasep trabajan con cromatografía extractiva para purificar y separar compuestos, también trabajan con cromatografía continua, cromatografía líquida a alta presión (HPLC por sus siglas en inglés *High pressure liquid chromatography*), cromatografía con fluidos supercríticos y cromatografía líquida a baja presión con intercambio iónico y tienen unas capacidades productivas de 1,5 kg/semana, 1 g/día, 5-300 g/día y 0,1-100 kg/mes respectivamente (41). Esto nos da una idea de cómo actualmente se utilizan estas técnicas y de la capacidad productiva que tienen, se obtienen productos con un elevado grado de pureza pero la capacidad de tratamiento es menor a otras tecnologías como las membranas o las resinas de adsorción.

Sun et al. (42) realizaron un estudio dónde implementaron un sistema de separación de los polifenoles presentes en muestras de vino tinto envejecido mediante técnicas de extracción de fase sólida y cromatografía líquida. Antes de tratar el extracto se desalcoholizaron 5 ml de muestra al vacío, a temperaturas por debajo de los 30°C, y más tarde se neutralizaron mediante una solución 0,1M de NaOH hasta pH neutro, y además se añadieron 5 mL de disolución tampón fosfato salina a pH igual a 7 para asegurar el pH neutro en la muestra. El sistema propuesto consta de diversas fases, compuestas

de columnas cromatográficas y diferentes solventes, obteniendo finalmente un total de siete corrientes compuestas cada una de ellas por diferentes componentes, como, por ejemplo, ácidos fenólicos, flavonol o antocianina. Las corrientes resultantes del sistema de separación en fase sólida se analizaron mediante HPLC, concluyendo que el método utilizado fraccionaba satisfactoriamente los polifenoles presentes en la muestra inicial. Se consiguió separar las antocianinas y sus derivados pirúvicos de las proantocianidinas y otros compuestos fenólicos utilizando 5 g de gel de sílice LiChroprep RP 18 (tamaño de partícula de 25-40 μm) suspendidas en metanol, las condiciones de operación fueron: caudal de 1 ml/min, 30°C, elución isocrática con 45% B (acetonitril/agua/ ácido fórmico, 70/20/10, v/v/v) durante 5 minutos, seguido de una elución gradual de la concentración de B desde 45% hasta 100% durante 2 minutos y finalmente una elución isocrática con 100% de B durante 13 minutos.

Deeb et al. (43) estudiaron la separación de polifenoles presentes en aguas residuales de la producción del aceite de oliva mediante una columna cromatográfica de sílice (Silica Gel 60 y Silica Gel G/UV₂₄₅). Se utilizaron como solventes n-hexano, etil acetato, metanol, cloroformo, diclorometano, amoníaco, benceno y piridina. El tratamiento de la muestra pasa por 3 columnas y diversas composiciones de los solventes anteriormente enumerados, para finalmente obtener siete productos finales. Los productos purificados son: ácido trans-cinámico, ácido caféico, tirosol, hidroxitirosol, ácido ferúlico, ácido p-coumarico y ácido vanílico. Después de eliminar el solvente de las corrientes, los productos resultantes se analizaron mediante HPLC y se comprobó que todas las corrientes contenían los compuestos correspondientes a los productos enumerados anteriormente.

Degenhardt et al. (44) utilizaron cromatografía de alta velocidad en contra corriente (HSCCC por sus siglas en inglés, *High-speed countercurrent chromatography*) para la separación de polifenoles presentes en hojas de té verde y té negro. Las condiciones de operación del sistema consisten en un solvente formado por hexano/ acetato de etilo/metanol/agua con una composición de 1,5/5/1,5/5, con el componente más denso actuando como fase móvil, con un caudal de 2,8 mL/min. Mediante este sistema y el posterior análisis mediante HPLC se consiguió separar compuestos puros como la catequina, flavonoles, proantocianidinas y estrictinina. La HSCCC demostró un gran potencial para la separación de polifenoles específicos, pudiéndose purificar hasta 1 gramo diariamente. Las ventajas obtenidas en comparación con métodos como la HPLC son que no se utiliza una fase sólida estacionaria, las condiciones de operación son menos críticas, puesto que opera a temperatura ambiente, mediante una columna de separación fabricada a partir de un sistema de tubos de Teflón, y tiene la capacidad de tratar una mayor cantidad de producto, pudiéndose producir diariamente varios cientos de miligramos de componente puro.

2.7. Propuesta de tren de separación y/o concentración de polifenoles

En base a los estudios citados en los apartados anteriores, se realiza la siguiente propuesta de tren de membranas y procesos, incluyendo diferentes técnicas y tecnologías para la separación y/o concentración de polifenoles procedentes de residuos de la industria agroalimentaria.

El primer paso del sistema consiste en una fase de eliminación de pequeñas partículas e impurezas que pueda tener la muestra como por ejemplo restos de pieles o semillas procedentes de las matrices de los residuos. Mediante una membrana de UF de 150 kDa, trabajando a 5 bares de TMP, se consigue un porcentaje de rechazo de polifenoles totales del 24%, obteniéndose así un corriente de permeado libre de partículas en suspensión y rico en polifenoles.

La corriente de permeado de la etapa de UF es tratada entonces con la resina DOWEX 21K XLT, que en estudios previos ha demostrado la capacidad de separar los polifenoles de la familia de los HB en prácticamente un 100%, obteniendo de esta manera una corriente rica en esta familia. Más tarde será tratada con una membrana de OI (AG2521Tf) con una alta capacidad de concentración de polifenoles (99,3% de rechazo total de polifenoles), para aumentar su pureza.

Por otro lado, la corriente pobre en HB de salida de la etapa anterior, es tratada mediante la resina AB-8, la cual presenta unos porcentajes de recuperación de flavonoides cercanos al 82%. La corriente de rechazo de la resina AB-8, con un porcentaje en flavonoides de aproximadamente el 18%, es tratada de nuevo por una etapa con la resina AB-8, de esta manera se consigue otra corriente rica en flavonoides, que junto a la obtenida por el paso anterior, constituyen una corriente con un porcentaje de polifenoles recuperados cercano al 97%. Esta corriente es tratada mediante la membrana AG2521Tf para aumentar su concentración total de polifenoles.

La corriente de rechazo obtenido de las dos etapas con resina AB-8, es rico en polifenoles de la familia de los HC, puesto que en las etapas anteriores se han eliminado los polifenoles de las otras dos familias. Esta corriente es tratada mediante una membrana AG2521Tf para aumentar su pureza.

Finalmente, gracias a este sistema de separación se obtienen 3 corrientes con concentraciones muy elevadas de cada uno de las familias de polifenoles. Estas corrientes pueden ser tratadas posteriormente de manera individual mediante cromatografía extractiva para la separación y purificación de un compuesto fenólico en concreto. Mediante la técnica adecuada y el uso idóneo de los solventes se puede obtener un polifenol puro. Para obtener ácido vanílico o ácido gálico, de la familia de los HB, se trataría la corriente correspondiente mediante cromatografía extractiva, utilizando platos de gel de sílice y una composición de solvente del 30% de metanol y 70% de diclorometano en presencia de vapor de amoníaco. Por otro lado, si se quisiera obtener ácido caféico, se debería tratar la corriente rica en HC mediante una columna de cromatografía líquida con una

composición del solvente de 10% en metanol y 90% en cloroformo. Para obtener catequina, polifenol de la familia de los flavonoides, se debería tratar la corriente correspondiente mediante HSCCC utilizando como solvente una mezcla de hexano/ acetato de etilo/metanol/agua con una composición de 1,5/5/1,5/5, con el componente más denso actuando como fase móvil y un caudal de 2,8 mL/min.

En la Figura 8 está representado de manera esquemática el tren teórico de separación y/o concentración de polifenoles con los diferentes procesos anteriormente explicados.

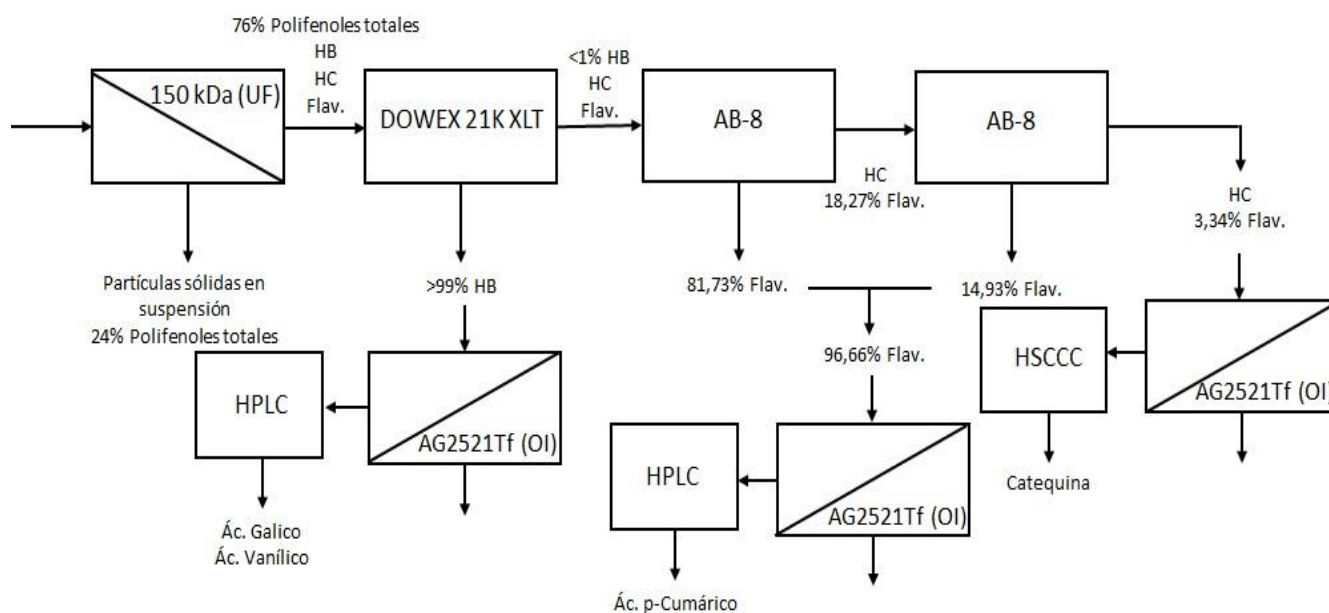


Figura 8. Esquema tren teórico para la separación y/o concentración de polifenoles.

3. Materiales y Métodos

3.1. Extracción de polifenoles

Las muestras a tratar en este proyecto son los residuos producidos durante la fabricación del vino y del aceite de oliva, es decir las lías del vino y el orujo de aceite, respectivamente. Estos productos se almacenan en tubos *Falcon* dentro del congelador a -20°C , para así evitar la pérdida o degradación de sus componentes y propiedades, como también para protegerlos de la aparición de microorganismos.

El orujo de aceite ha sido proporcionado por la empresa Borges, datados entre Noviembre y Febrero de los años 2017 y 2018.

Por otro lado, las lías de vino pertenecen a la recogida de lías de la empresa Torres durante el periodo de Agosto y Octubre del 2018.

Ambos residuos se pueden observar en la Figura 9.



Figura 9. Muestras de residuos Borges (izquierda) y de vino Torres (derecha).

Para poder tratar los polifenoles presentes en los residuos a estudiar primero se debe aplicar una técnica de extracción. Empleando la técnica de maceración, optimizada en trabajos previos para estos mismos residuos (45), se obtienen las siguientes condiciones:

En el caso de las lías de vino las condiciones de extracción son: la temperatura a 70°C , con una relación sólido-líquido 1:100 (g/mL), durante 10 minutos de extracción y sin ajustar el pH de la muestra.

Por otro lado, en el caso del orujo de aceite, las condiciones óptimas para realizar la extracción son: a 25°C, con una relación sólido-líquido 1:30 (g/mL), durante 10 minutos de extracción y sin ajustar el pH.

3.1.1. Procedimiento

La extracción de polifenoles mediante el proceso de maceración está formado por las siguientes etapas:

- Las muestras sólidas se sacan del congelador y se descongelan a temperatura ambiente (25°C).
- Se pesa, con la ayuda de una espátula y un cristal de reloj, la cantidad de muestra necesaria, en una balanza analítica, para preparar 500mL de disolución, teniendo en cuenta las relaciones sólido-líquido de cada residuo.
- Se llena un matraz de 500mL con agua Milli-Q para medir la disolución.
- Se mezcla el sólido y el agua Milli-Q dentro de una botella de cristal de 1 litro.
- En el caso de las muestras del orujo de aceite, puesto que la extracción se realiza a temperatura ambiente, se introduce un imán dentro de la botella y se deja agitando en un agitador durante 10 minutos. Por otro lado, en el caso de las lías de vino, se debe agitar igualmente con la ayuda de un imán y un agitador a la vez que se calienta la muestra hasta 70°C, el tiempo de extracción empieza en el momento en que la disolución llega a la temperatura objetivo. Ambas agitaciones se realizan a 3000rpm.
- Una vez se ha completado el tiempo de extracción, se deja la botella a temperatura ambiente durante 10 minutos en el caso de las lías de vino para enfriarla, de esta manera evitamos la rotura de los tubos *falcon* en el proceso de centrifugación.
- Se introduce la disolución en 4 tubos *falcon*, debidamente equilibrados para evitar el mal funcionamiento de la centrifugadora.
- Los tubos *falcon* se introducen en la centrifugadora y se pone en funcionamiento a 3500rpm durante 15 minutos para separar la disolución de los residuos sólidos en suspensión.
- Finalmente, después de centrifugar la disolución, esta se almacena en botellas de 1 litro dentro de la nevera, para evitar que se contamine la muestra y para preservar sus características.

3.2. Separación y/o concentración de polifenoles con tecnología de membranas

3.2.1. Membranas

Los ensayos de separación y/o concentración mediante tecnología de membranas se realizan mediante diferentes tipos de membranas: ultrafiltración, nanofiltración y ósmosis inversa. En la Tabla 3 se exponen las membranas utilizadas y sus principales características:

Tabla 3. Membranas utilizadas y sus características.

Membrana	Fabricante	Composición de la membrana
Ultrafiltración		
Filtros en formato de disco de 30kDa	Millipore	Mezcla de acetato y nitrato de celulosa (MCE)
Filtros en formato de disco de 50kDa	Millipore	Mezcla de acetato y nitrato de celulosa (MCE)
Nanofiltración		
DURACID	Suez	Sulfamida de capa activa y polisulfona de soporte
NF90	Dow-Filmtec	Poliamida semiaromática de capa activa
NF270	Dow-Filmtec	Amida aromática de capa activa
Ósmosis inversa		
BW30LE	Dow-Filmtec	Poliamida aromática de capa activa con la superficie cubierta de alcohol polivinilo

En el anexo A1 se encuentran las características de otras membranas de nanofiltración (TFCS y TFCS-HR) y ósmosis inversa (XLE y SW30HR) que se necesitan para comparar con este trabajo.

3.2.2. Módulo memHPLC

El módulo de memHPLC (MMS, Suiza) consiste en una celda de membranas, en la cual se instala la membrana, habilitando un área activa de 113 cm^2 a través de la cual se bombea el extracto con bomba de alta presión, *Waters 515 HPLC Pump*, obteniendo un caudal de rechazo y uno de permeado. Finalmente, se utilizan otros equipos como tubos de conexión, balanza gravimétrica, para medir el peso de permeado, y una placa agitadora para mantener el depósito de alimentación en constante agitación y de esta manera asegurar la homogeneidad del extracto. En la Figura 10 se muestra el montaje en el laboratorio.

Para trabajar en un sistema en cerrado se dirigen los dos caudales de salida de la celda de membranas hacia la alimentación, si por el contrario se desea trabajar en abierto, estos caudales se recogen en depósitos diferentes. Para tratar los extractos mediante un tren de membranas es necesario trabajar en abierto.

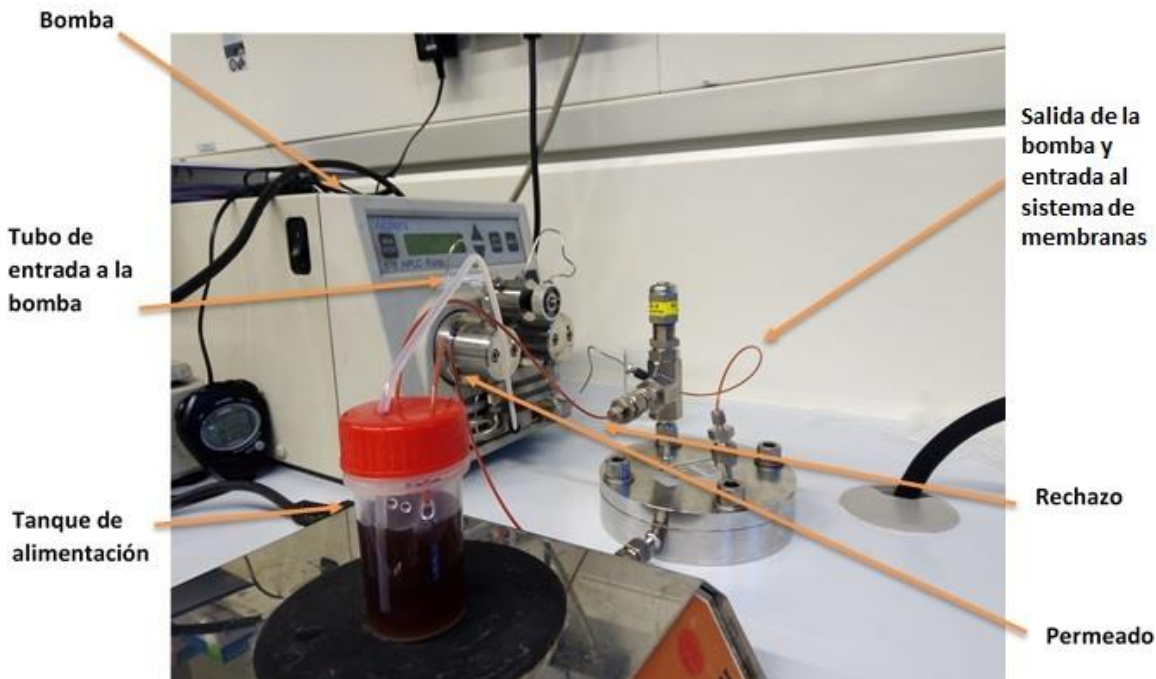


Figura 10. Montaje del procedimiento memHPLC en cerrado.

3.2.3. Procedimiento del módulo memHPLC

El procedimiento realizado en el laboratorio es el siguiente:

- El primer paso para las membranas de NF y OI consiste en recortarlas y dejarlas sumergidas en agua Milli-Q durante las 24h previas al inicio del experimento, para de esta manera eliminar los productos de conservación de las membranas y densificar la capa de soporte de las

membranas. Este proceso no es necesario llevarlo a cabo para las membranas de UF dado que no son membranas densas.

- Antes de empezar con el experimento se purga la bomba con agua Milli-Q durante 5 minutos con un caudal de 5 mL/min para eliminar impurezas en el sistema.
- Se miden 30 mL de extracto y se almacenan en el depósito de 50 mL que sirve de tanque de alimentación.
- Se coloca la membrana en la celda de membranas. Las membranas de NF y de OI tienen una capa activa (más brillante) y otra no activa, la capa activa debe quedar siempre orientada hacia arriba dentro de la celda, ya que es el lado por dónde entra la alimentación. En el caso de las membranas de UF no importa la posición de esta dado que ambos lados de la membrana pueden filtrar. Bajo la membrana siempre se coloca un *spacer* o separador, que consiste en una reja fina hecha de un material inerte que no afecta al experimento, esta sirve para evitar roturas en las membranas y para evitar el contacto directo de la membrana con la parte inferior del módulo.
- Para las membranas de NF y de OI primero se debe llevar a cabo una etapa de presurización, al contrario que con la UF, que no es necesaria esta etapa puesto que no hace falta eliminar ni densificar ni eliminar los productos de conservación de la capa activa de la membrana. Para ello se bombea extracto a través del sistema a 10 mL/min para acondicionar las membranas a las condiciones de trabajo. El rango de caudal para el cual se realizan los experimentos es de 1 mL/min a 10 mL/min, con un aumento de 1 mL/min. Se mide la conductividad cada 10 minutos hasta que se obtengan dos valores iguales consecutivos, momento en el cual se considera que la membrana está presurizada y lista para realizar el experimento.
- Se empieza el experimento ajustando un caudal de alimentación de 1 mL/min. Se deja estabilizar el sistema durante cinco minutos y entonces se extrae 1 mL de muestra de permeado. Se aumenta 1 mL/min el caudal y se repite el procedimiento hasta llegar al caudal máximo definido anteriormente.
- Se pesan los volúmenes de permeado obtenidos y se calcula el tiempo que se tarda en obtenerlos mediante un cronometro. Con estos datos se calcula el caudal de permeado.
- Una vez finalizado el experimento se retira la membrana mientras se purga la bomba. Se lava la celda de membranas con agua Milli-Q y se seca.
- Todos los experimentos se realizan por duplicado.

3.2.4. Planta plana

Cómo “scale-up” del módulo de membranas memHPLC, se lleva a cabo el proceso de separación y/o concentración con una planta plana, dos membranas de nanofiltración (DURACID y NF90) y el extracto de lías de vino. En ella se pueden tratar mayores caudales y cantidades del extracto, en el caso de este estudio hasta 5 L/min y 2 litros de extracto respectivamente.



En el depósito donde se encuentra la disolución, se ha utilizado un tanque refrigerante, en la Figura 11, para mantener la temperatura de la muestra por debajo del límite de trabajo de la membrana, entre los 45 y 48°C, y la bomba, esta última es una *Hydra Cell G-10*, en la Figura 12, la cual mediante diferentes tubos de conexión bombea la disolución a lo largo de todo el circuito.



Figura 11. Tanque de alimentación



Figura 12. Bomba Hydra Cell G-10

Al salir de la bomba la disolución pasa por una válvula de *by-pass* que se divide en un tubo de escapatoria que vuelve al tanque de alimentación y un tubo de acero que conecta directamente con la celda de membranas.

En la Figura 13 se puede ver la celda de membranas plana, la cual tiene un área de contacto de 140 cm², con la ayuda de una prensa hidráulica y una bomba de mano, se presuriza la celda hasta 30

bares, ya que en funcionamiento la TMP del sistema puede superar los 22 bares y este valor siempre debe ser inferior al de la prensa hidráulica.

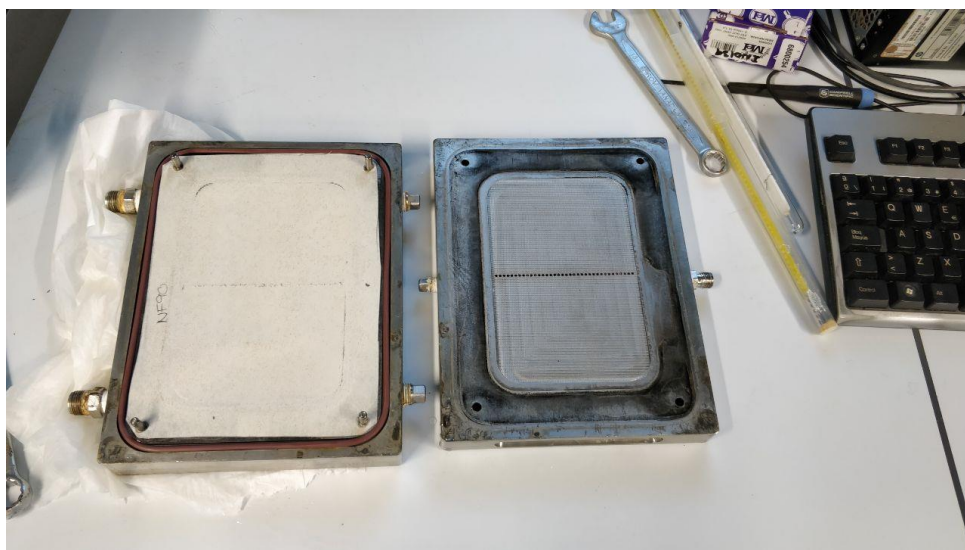


Figura 13. Celda de membranas

La salida del permeado vuelve directamente a la alimentación, mientras que en la salida del rechazo encontramos una válvula de aguja, con la ayuda de esta y de la válvula *by-pass* se puede controlar la TMP y el caudal de trabajo en todo momento. Para medir este caudal encontramos un caudalímetro digital después de pasar por la válvula de aguja.

Finalmente, antes de finalizar el recorrido se encuentra un filtro de cartucho (50 μm) con el cual eliminar pequeñas impurezas que pueda haber en la muestra.

En la Figura 14 se resaltan las diferentes partes ya explicadas del circuito de membranas:

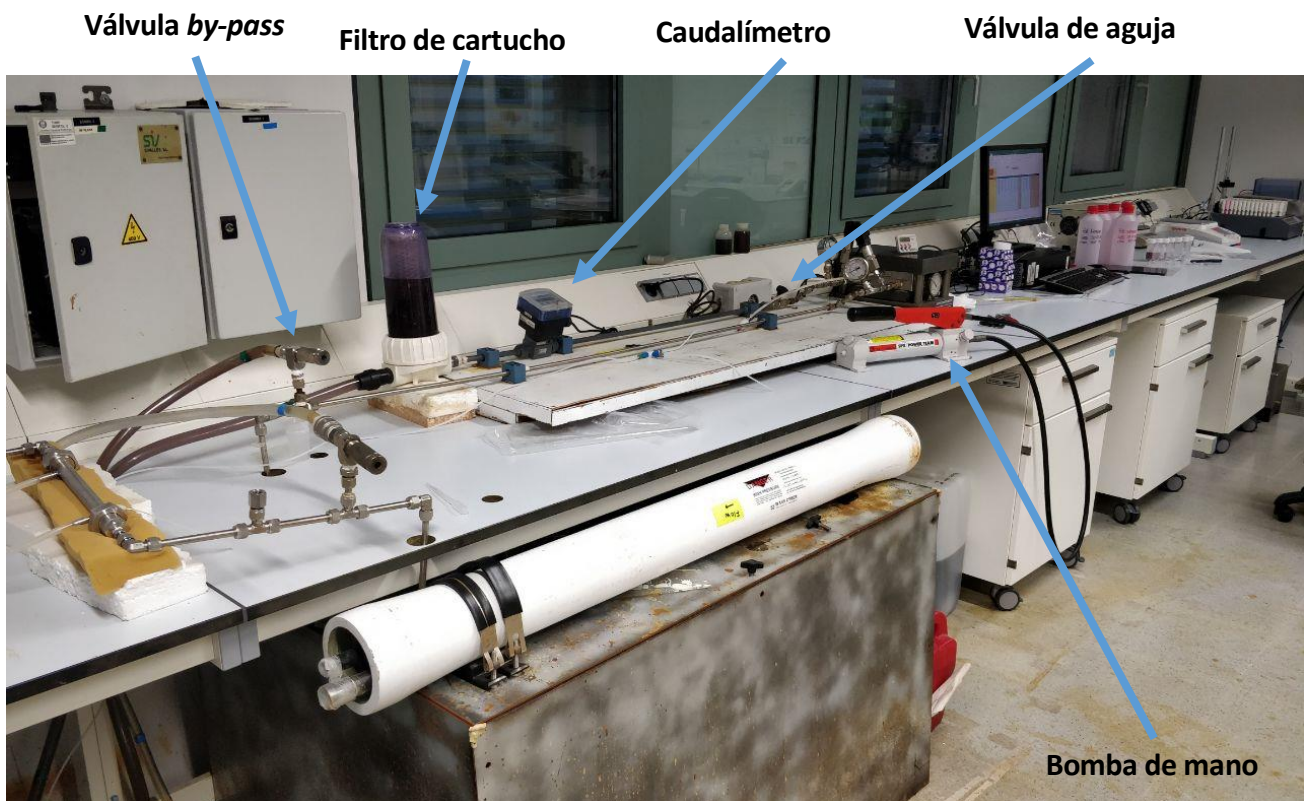


Figura 14. Configuración de la planta plana para ensayos de filtración con membranas de NF.

3.2.5. Montaje y funcionamiento de la planta plana

El proceso para la puesta a punto de la planta plana con las membranas de nanofiltración es el siguiente:

- El primer paso consiste en recortar las membranas utilizando un patrón para que encajen perfectamente en la celda de membranas. Es muy importante no tocar en ningún momento la cara activa de la membrana ya que se contamina muy rápidamente.
- Una vez recortadas, las membranas se deben guardar sumergidas en agua Milli-Q durante las 24 horas previas al experimento, de esta manera se eliminan los productos de conservación de las membranas y se densifica el soporte de estas.
- Se colocan las dos juntas de goma entre las dos mitades de la celda de membranas, así como los *spacers* o separadores, el de mayor tamaño de agujeros se coloca en la entrada de la alimentación, mientras que el de ranura pequeña se coloca en la salida del permeado, ambos separadores deben encajar correctamente, sin que ninguna parte sobresalga. Para acabar de fijarlos y que no se muevan se aplica un poco de agua destilada encima.
- Se coloca la membrana con la parte activa de cara a la entrada de la alimentación (hacia abajo) y se fija la membrana con la ayuda de unas gotas de agua destilada.

- Lo siguiente consiste en cerrar la celda de las membranas y colocarla dentro de la prensa hidráulica de tal manera que las conexiones de la celda y los tubos de alimentación y rechazo coincidan y se puedan apretar correctamente. También se conecta la salida del permeado.
- Con la ayuda de la bomba de mano se presuriza la celda hasta los 30 bares, este proceso se realiza muy despacio debido a que un cambio brusco de presión podría romper la membrana.
- Colocar el filtro de cartucho correctamente, apretando lo máximo posible el encaje para evitar posibles pérdidas durante el experimento. Si el filtro es nuevo, se debe hacer pasar agua a través de él hasta que deje de producir espuma, para así eliminar los productos de conservación y limpieza que pueda tener.
- Una vez la planta está montada se debe llenar el tanque refrigerador con agua y encenderlo, es recomendable encenderlo con al menos 40 minutos de antelación para que así al empezar el experimento nuestra muestra este a la menor temperatura posible (8°C-10°C).
- Se vierten 5 litros de la disolución muestra dentro de un recipiente que se sumerge en el tanque refrigerador, para así poder enfriar la muestra durante el experimento, ya que al trabajar a altas presiones esta se sobrecalienta.
- Todos los tubos de entrada y de salida del circuito se sumergen dentro de la muestra, es muy importante que queden bien fijados ya que a altas presiones estos vibran mucho. También es muy importante que el tubo de alimentación este colocado de tal manera que no pueda entrar en contacto ni con otro tubo, ni con la pared ni el suelo del recipiente y que en todo momento esté sumergido, ya que, si no puede hacerse el vacío o entrar aire en el sistema, rompiéndose la bomba y/o la membrana.
- Finalmente, antes de empezar con el experimento se enciende el caudalímetro digital, el cuadro eléctrico de control de la bomba y se aflojan al máximo las dos válvulas del sistema asegurando que están completamente abiertas.
- En el cuadro de control de la bomba, ir aumentando los hercios de trabajo de 5 en 5 y muy despacio hasta llegar a 35 Hz.
- Mediante las dos válvulas del sistema regular la TMP y el caudal deseado. Al cerrar la válvula *by-pass* la TMP aumenta rápidamente, también aumenta el caudal de disolución a través del sistema. En cambio, al cerrar la válvula de aguja, la TMP aumenta muy poco, y el caudal disminuye significativamente, esta válvula es muy sensible. El caudal y sobretodo la TMP deben aumentarse y disminuirse muy lentamente para evitar dañar la membrana en el proceso.

Una vez en marcha la planta, la realización de un experimento conlleva las diferentes etapas que se muestran a continuación:

- 1) Presurización con agua destilada a 22 bares, caudal 5 L/min y durante 120 min.
- 2) Presurización con la muestra a tratar a 22 bares, caudal 5 L/min y durante 120 min.

- 3) Experimento variado las presiones desde 1 bar a 22 bares y caudal constante de 3,46 L/min.
- 4) Limpieza corta con agua destilada a 22 bares, caudal 5 L/min y durante 30 min.
- 5) Limpieza larga con agua destilada a 22 bares, caudal 5 L/min y durante 90 min.

Cada vez que se utilice una membrana nueva, esta se presuriza con agua destilada para asegurar que la membrana funciona correctamente, esto consiste en hacer trabajar el sistema en cerrado a 22 bares de TMP y un caudal de 5 L/min durante 2 horas, tomando muestras de permeado cada 15 minutos para controlar el pH, temperatura y conductividad. El parámetro de la conductividad nos indica el momento en que la membrana está completamente estable y presurizada correctamente.

Después de la presurización con agua se lleva a cabo una presurización idéntica, pero con la muestra a tratar, una vez finalizadas ambas presurizaciones se puede llevar a cabo el experimento. El caudal debe permanecer constante en 3,46 L/min y se varía la TMP desde la presión osmótica (presión mínima en la cual la membrana produce caudal de permeado) hasta 22 bares. Se toma muestra a los 10 minutos de haber cambiado la TMP, se mide la temperatura, pH y conductividad de las muestras y se guarda una pequeña cantidad para analizar posteriormente mediante el HPLC, también se guardan muestras para analizar de la alimentación antes de realizar el experimento y al finalizarlo.

Después de realizar un experimento se realiza una limpieza corta, durante 30 minutos con agua destilada, a 10 bares de TMP y 5 L/min de caudal. Esta limpieza ayuda a eliminar los restos de disolución del sistema antes de la limpieza larga. La limpieza larga se realiza durante una hora y media, con una alimentación nueva de agua destilada, a 22 bares de TMP y 5 L/min, tomando muestra de permeado cada 15 minutos, con esta etapa se busca limpiar la membrana para poder reutilizarla en la réplica del experimento, además de servir de etapa de presurización previa al experimento. Para determinar si la membrana sigue siendo viable para utilizar hay que comprobar los valores de la constante de permeabilidad (K_w), que deben ser iguales o ligeramente inferiores a la presurización inicial con agua, en caso contrario se debe hacer una segunda o tercera limpieza larga y si así no se consigue el valor de K_w , descartar la membrana y utilizar una nueva.

La segunda réplica del experimento se realiza de manera idéntica a la primera. Una vez finalizado el experimento se extrae la membrana y se guarda en una bolsa de plástico, se vuelve a montar el equipo y se realiza una purga de la planta poniéndola en funcionamiento sin membrana, con agua destilada y en abierto para eliminar impurezas y restos de la muestra del circuito.

Una vez finalizado el experimento, para apagar la planta plana hay que seguir los siguientes pasos:

- Disminuir lentamente la TMP mediante las válvulas de *by-pass* y de aguja, manteniendo el caudal del sistema entre 2 L/min y 6 L/min, hasta que la TMP sea de 1 bar.

- Disminuir los hercios de la bomba de 5 en 5, de la misma forma que en su puesta en marcha hasta llegar a 0.

3.2.6. Tratamiento de datos

Para determinar el rendimiento y eficacia de la membrana durante todo el proceso se deben realizar una serie de cálculos cada vez que extraemos una muestra, es importante pesar el volumen de permeado extraído y anotar el tiempo de extracción ya que de esta manera se puede calcular el flujo de permeado (J_v) mediante la Ecuación 1. Tanto a pequeña escala como en la planta plana se utiliza la misma ecuación, sin embargo, en el posterior análisis de los resultados experimentales existe diferencias en las unidades utilizadas a conveniencia de los valores obtenidos, en el caso del módulo memHPLC el flujo de permeado tiene unidades ($L/h \cdot m^2$) y en cambio este mismo flujo en la planta plana se expresa en ($\mu m/s$).

$$J_v = \frac{Q_p}{A_m} = \frac{V_p}{t_e \cdot A_m} = \frac{\frac{m_p}{\rho_p}}{t_e \cdot A_m}$$

Ecuación 1. Flujo de permeado

Siendo:

- Q_p el caudal de permeado en [L/h] para el módulo memHPLC, [m^3/s] para la planta plana.
- A_m el área de la membrana en [m^2]
- V_p el volumen de permeado extraído en [L] para el módulo memHPLC, [m^3] para la planta plana.
- t_e el tiempo de extracción de permeado en [h] para el módulo memHPLC, [s] para la planta plana.
- m_p la masa extraída de permeado en [g] para el módulo memHPLC, [kg] para la planta plana.
- ρ_p la densidad del permeado en [g/L] para el módulo memHPLC, [kg/m^3] para la planta plana.

La densidad del permeado se calcula realizando 3 pesadas de un volumen conocido de extracto, dividiendo el peso entre el volumen y haciendo la media de estos 3 resultados se obtiene la densidad de los extractos.

El parámetro de permeabilidad hidráulica (K_w) nos indica la fluidez con la que la disolución pasa a través de la membrana, se calcula siguiendo la Ecuación 2:

$$K_w \left(\frac{\mu m}{s \cdot bar} \right) = \frac{J_v}{TMP - \Delta\pi}$$

Ecuación 2. Permeabilidad hidráulica.

Donde la TMP es el resultado de hacer la media de presiones entre la entrada de alimentación y la salida de rechazo en la celda de membranas menos la presión en la corriente de permeado, como se muestra en la Ecuación 3. $\Delta\pi$ hace referencia a la presión osmótica, en el caso del agua destilada este valor es igual a cero.

$$TMP \text{ (bar)} = \frac{P_{in} + P_{out}}{2} - P_{permeado}$$

Ecuación 3. Presión trans-membrana.

Finalmente, para calcular el rechazo producido por la membrana, es decir, la cantidad de polifenoles que no han conseguido pasar a través de la membrana hacia el permeado, se utiliza la Ecuación 4:

$$R \text{ (\%)} = \left(1 - \frac{C_p}{C_a}\right) \cdot 100$$

Ecuación 4. Porcentaje de Rechazo

Siendo:

- C_p la concentración de polifenoles en las muestras de permeado en [mg/L]
- C_a la concentración de polifenoles en la muestra inicial de alimentación en [mg/L]

3.3. Determinación de polifenoles

Para analizar las muestras de permeado y cuantificar la concentración de polifenoles en estas se utiliza un equipo de cromatografía de alta eficacia, HPLC por sus siglas en inglés (*High performance liquid chromatography*). Este equipo es un Agilent Series 1100 con sistema de inyección, bomba cuaternaria y una matriz con diodos detectores. La columna en la cual se lleva a cabo el proceso de análisis es una Kinetex C18 donde los componentes polares son los que se difunden a través de la columna con mayor velocidad y los componentes no polares se retienen durante más tiempo. La columna cromatográfica tiene unas medidas de 100 mm x 4,6 mm x 2,6 μ m.

La fase móvil de la cromatografía está formada por dos fases, una fase acuosa de ácido fórmico (EMSURE, 98%-100% disolvente A) al 0,1% en agua Milli-Q y otra fase orgánica de acetonitrilo (Fisher Chemical, como disolvente B).

El equipo de HPLC está conectado a un ordenador, mediante el cual, con la ayuda del *software* AgilenteChemStation, se controla el método de inyección y el funcionamiento del sistema, los resultados obtenidos también se tratan con este programa, en la Figura 15. Equipo HPLC. se puede observar el montaje del sistema.



Figura 15. Equipo HPLC.

Las condiciones de trabajo del sistema son de un caudal de fase móvil de 0,4 mL/minuto y la presión de la bomba se limita a 400 bares. Antes de cada análisis el sistema necesita un tiempo de estabilización y acondicionamiento, normalmente a unos 80 bares. Una vez listo el sistema inyecta 5µL de la muestra y se registran 3 cromatogramas a diferentes longitudes de onda en el espectro UV (280 nm, 310 nm y 370 nm). En cada una de estas longitudes de ondas se identificará una de las familias de polifenoles, los hidroxibenzoicos (HB) a 280 nm, los hidroxicinámicos (HC) a 310 nm y los flavonoides a 370 nm.

Antes de analizar las muestras obtenidas de los experimentos, se inyectan en el equipo cuatro mezclas patrón de polifenoles sintéticos. Estos patrones contienen los polifenoles que se espera encontrar en los extractos a analizar, tanto de lías de vino como de orujo de aceite, tales como el ácido gálico (HB), ácido caféico (HC) y hesperidina (flavonoide). Además, al estar estandarizadas, se conocen la concentración de cada uno de los polifenoles en las mezclas patrón, esto sirve para comprobar y calibrar que el análisis se hace correctamente.

Durante el análisis de las muestras experimentales, cada inyección dura alrededor de 50 minutos, durante los cuales la bomba inyecta un gradiente de las fases acuosa y orgánica durante el tiempo. Los gradientes son diferentes para cada tipo de muestra, siendo para las lías de vino el que se muestra en la Tabla 4 y para orujo de aceite el que se representa en la Tabla 5.

Tabla 4. Gradiente para el análisis de lías de vino.

Tiempo (minutos)	0	38	40	42	42.2	50
Porcentaje de fase orgánica B (%)	5	45	90	90	5	5

Tabla 5. Gradiente para el análisis de orujo de aceite.

Tiempo (minutos)	0	38	40	42	42.2	50
Porcentaje de fase orgánica B (%)	5	35	90	90	5	5

Para analizar los resultados, debido a la complejidad de la señal y en ocasiones la poca definición de los picos que identifican un polifenol en concreto, se estudia el área de debajo de estos picos, mediante la herramienta de integración manual que proporciona el *software* anteriormente comentado.

El área obtenida se traduce a concentración con la ayuda de las disoluciones patrón, donde la concentración de cada especie es conocida, de esta manera se puede establecer una relación entre el área del cromatograma y la concentración de un compuesto. Al realizar los análisis por área debajo los picos no se estudian de manera individual, por este motivo se escoge un compuesto de cada familia para ser el representante que establece la relación área/mg/L en los análisis de las muestras.

4. Resultados experimentales

4.1. Maceración

La extracción de polifenoles se ha realizado mediante la técnica de maceración, empleando las condiciones previamente optimizadas (45) y resumidas en la Tabla 6.

Tabla 6. Condiciones óptimas de maceración.

Extracto	Relación sólido-líquido (g/mL)	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)	pH	Densidad (g/mL)
Lías de vino	1:100	10	70	5 (sin ajuste)	0,976
Orujo de aceite	1:30	10	25	5 (sin ajuste)	0,983

Antes y después de realizar los experimentos se ha extraído una pequeña cantidad del extracto para su posterior análisis con el HPLC, de esta manera se han obtenido las concentraciones totales de los polifenoles en cada uno de los extractos. Para el extracto de las lías de vino se ha obtenido una concentración total de polifenoles de 33 mg/L, mientras que con el extracto de orujo de aceite se ha obtenido una concentración de 172,8 mg/L.

La concentración total se ha determinado mediante equivalentes de ácido gálico (GAE por sus siglas en inglés) y la integración total de los picos obtenidos en el cromatograma a una longitud de onda de 280nm. En la Figura 16 se puede ver el cromatograma obtenido con el extracto de lías de vino, en azul la muestra del extracto inicial y en rojo la muestra de este mismo extracto al finalizar con el experimento en cerrado. Dentro del cromatograma se pueden diferenciar las diferentes familias de polifenoles, dentro del círculo azul se encuentran los HB (entre los 5 y 15 minutos), los HC en color rojo (entre 15 y 22 minutos) y finalmente los flavonoides en verde (de 22 a 35 minutos). La concentración de cada una de estas familias se ha determinado realizando la integración en los intervalos de tiempo anteriormente mencionados y a la longitud de onda correspondiente (280 nm para los HB, 310 nm para los HC y 370 nm para los flavonoides). Los pesos moleculares de estas familias es de entre 100 y 200 Da para los HB, 150 a 250 Da en el caso de los HC y entre los 200 y 700 Da en la familia de los flavonoides.

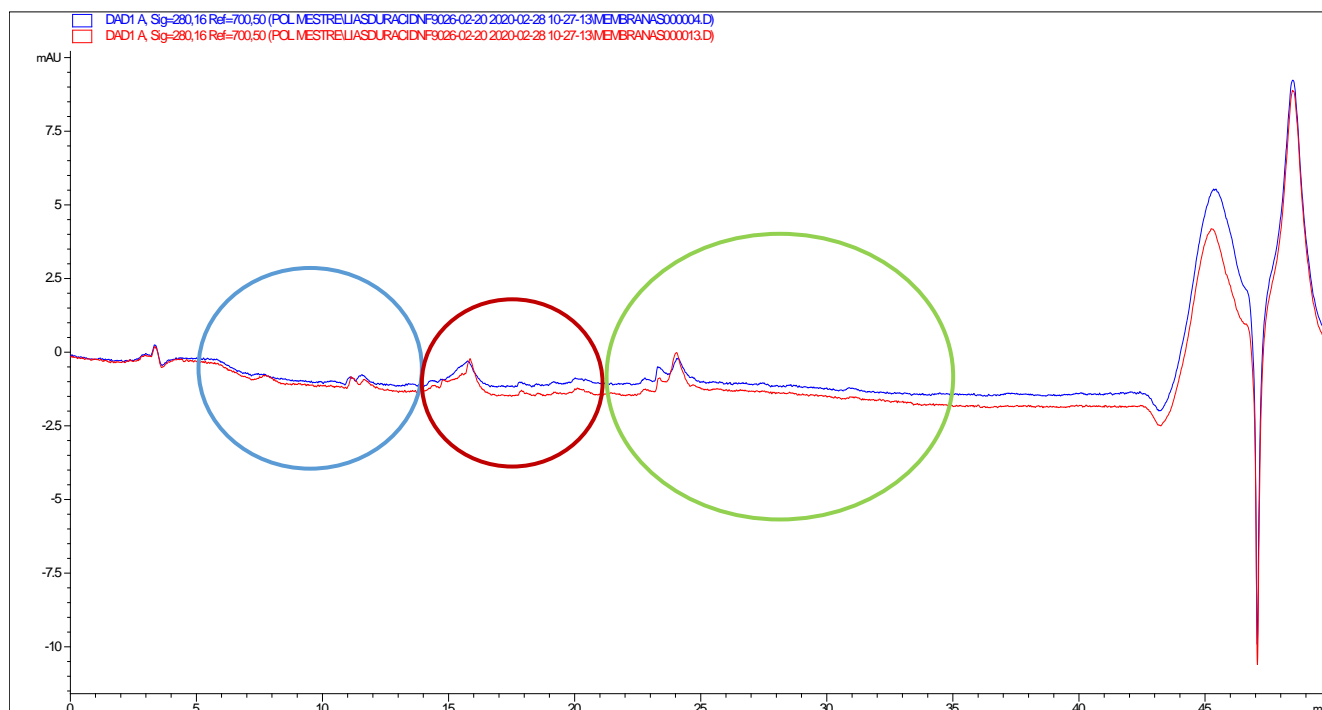


Figura 16. Cromatograma alimentación y final lías.

Safdar et al. (21) realizaron un estudio dónde cuantificaron la cantidad de polifenoles extraídos por maceración de la piel de mandarina. La mayor cantidad de polifenoles extraídos mediante maceración fue utilizando metanol al 80% como disolvente (28,4 mg GAE /g de extracto) mientras que la menor concentración se obtuvo con etil acetato al 80% (8,64 mg GAE/g de extracto). Los resultados obtenidos en este trabajo, 10,4 mg GAE/g de extracto de orujo de aceite y 6,6 mg GAE/ g de extracto de lías de vino, son similares a los obtenidos utilizando etil acetato como disolvente de la maceración.

4.2. Módulo memHPLC

4.2.1. Ultrafiltración (UF)

En la Figura 17 y Figura 18 se representa la relación entre el caudal de entrada y el flujo de permeado para cada uno de los extractos.

En el caso del extracto de lías de vino se observa una tendencia lineal entre el aumento del flujo de permeado y el caudal de entrada en el caso de la membrana 30 kDa. Por otro lado, en el caso de la membrana de 50 kDa la relación no es tan lineal, muestra una dispersión mayor a flujos elevados, producida por la heterogeneidad de la muestra. Ambas membranas presentan un rango de flujo de permeado entre los 2 y 12 L/h·m². Al tener un comportamiento lineal, para la membrana de 30 kDa se trabaja a un caudal de entrada de 10 mL/min. Sin embargo, la membrana de 50 kDa estabiliza su flujo

entre los 10 y 12 L/h·m² a partir de un caudal de entrada de 6 mL/min, por este motivo no se trabaja con caudales de entrada superiores a este valor.

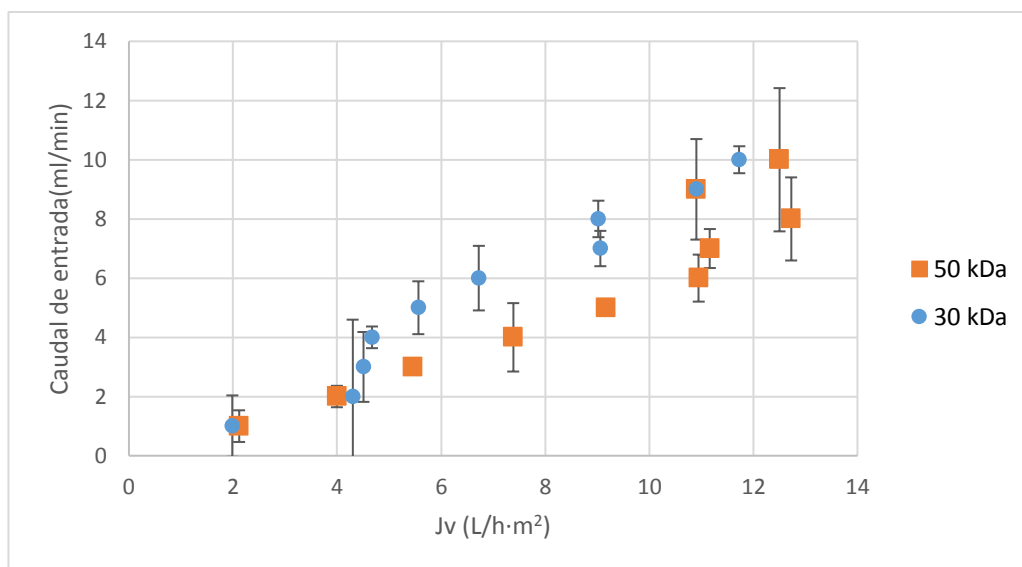


Figura 17. Flujo de permeado vs caudal de entrada para el extracto de lías de vino.

Para el extracto de orujo de aceite se observa una tendencia a aumentar hasta llegar a estabilizarse el flujo de permeado, esto sucede a los 7 mL/min en el caso de la membrana de 30 kDa y a 6 mL/min en el caso de la membrana de 50 kDa. Los valores de flujo de permeado para estos caudales de entrada son de 5,25 y 5 L/h·m² respectivamente. La diferencia de comportamiento entre los dos extractos se puede deber a la diferencia en la concentración, una mayor concentración produce mayores fenómenos de ensuciamiento en la membrana.

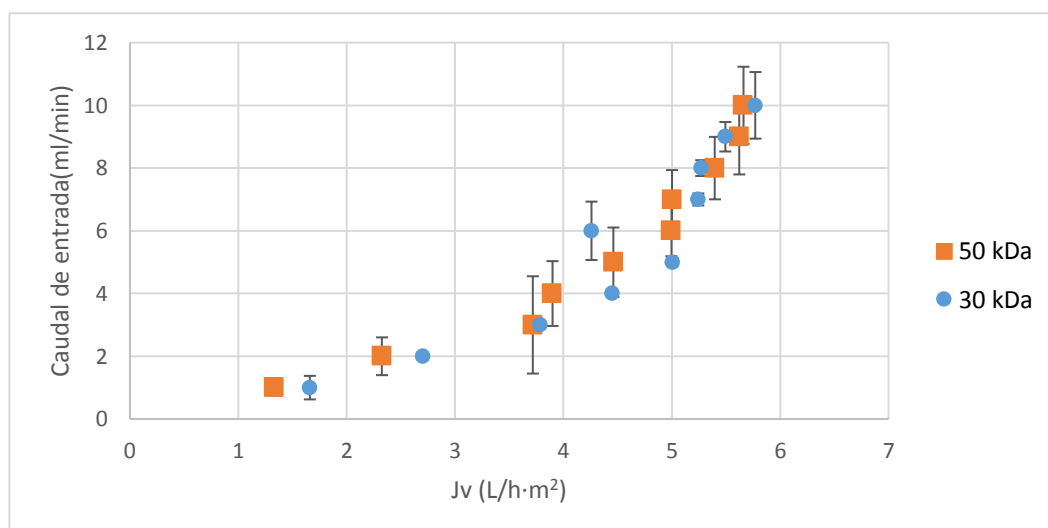


Figura 18. Flujo de permeado vs caudal de entrada para el extracto de orujo de aceite.

La concentración total de polifenoles en el permeado del extracto de lías de vino para la membrana de 30 kDa es de $19,1 \pm 0,3$ mg/L (a 1 mL/min) y $20,2 \pm 0,3$ mg/L (a 10 mL/min). Por otro lado, para la membrana de 50 kDa, a los mismos caudales de entrada, se obtienen unas concentraciones totales de polifenoles de $23,4 \pm 2,4$ mg/L y $20,5 \pm 0,4$ mg/L, respectivamente.

Los resultados de concentraciones totales se traducen en los siguientes porcentajes de rechazo: para la membrana de 30 kDa, $41,8 \pm 0,9\%$ (1 mL/min) y $38,7 \pm 0,9\%$ (10 mL/min) y para la membrana de 50 kDa $29,1 \pm 7,0\%$ y $38,0\% \pm 1,3\%$ para los mismos caudales de entrada.

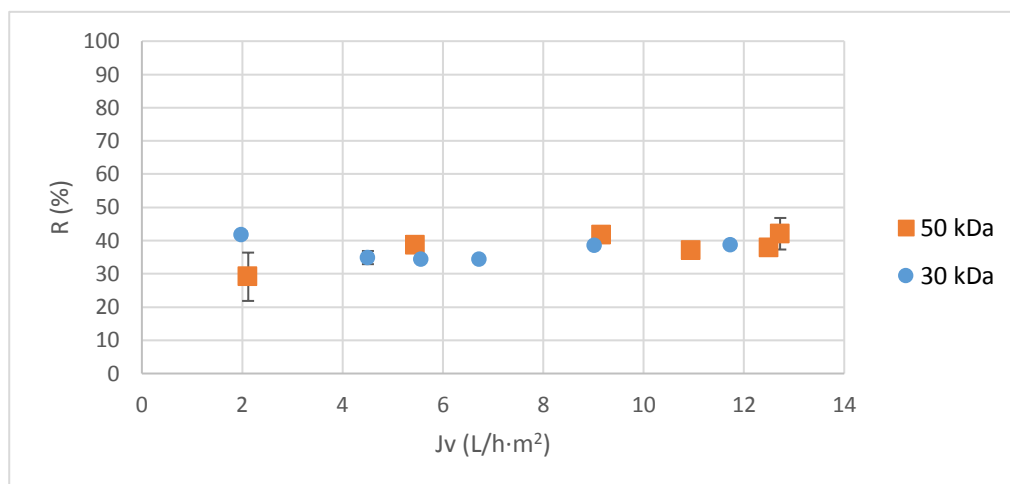


Figura 19. Porcentaje de rechazo de polifenoles totales en función del flujo de permeado para el extracto de lías de vino.

Giacobbo et al. (25) realizaron un estudio con una membrana de UF y otra de NF para la recuperación de polifenoles procedentes de aguas residuales de la fabricación del vino. La membrana de UF (ETNA 01PP) con un área de membrana de $14,5 \text{ cm}^2$ obtuvo unos porcentajes de rechazo de polifenoles totales sobre 44,5% a en un rango de flujos de permeado entre 10 y $35 \text{ L/h}\cdot\text{m}^2$. Los resultados son similares a los obtenidos en este estudio, a pesar de utilizar un área efectiva 8 veces menor que en este trabajo el módulo de membranas permitía tratar un mayor flujo de permeado, dónde con la membrana de 30 kDa y el extracto de lías de vino, se obtienen unos rechazos alrededor del 40%.

El mismo análisis de polifenoles totales en el extracto de orujo de aceite da como resultado para la membrana de 30 kDa de $92 \pm 0,1$ mg/L y $103 \pm 3,1$ mg/L a 1 mL/min y 10 mL/min, respectivamente; y de $96 \pm 6,4$ mg/L y 111 ± 2 mg/L para la membrana de 50 kDa para los mismos caudales respectivamente. Los porcentajes de rechazo obtenidos en ambas membranas para el caudal mínimo de entrada (1 mL/min) son $45 \pm 3,7\%$ y para el caudal máximo (10 mL/min) un $35 \pm 1,2\%$.

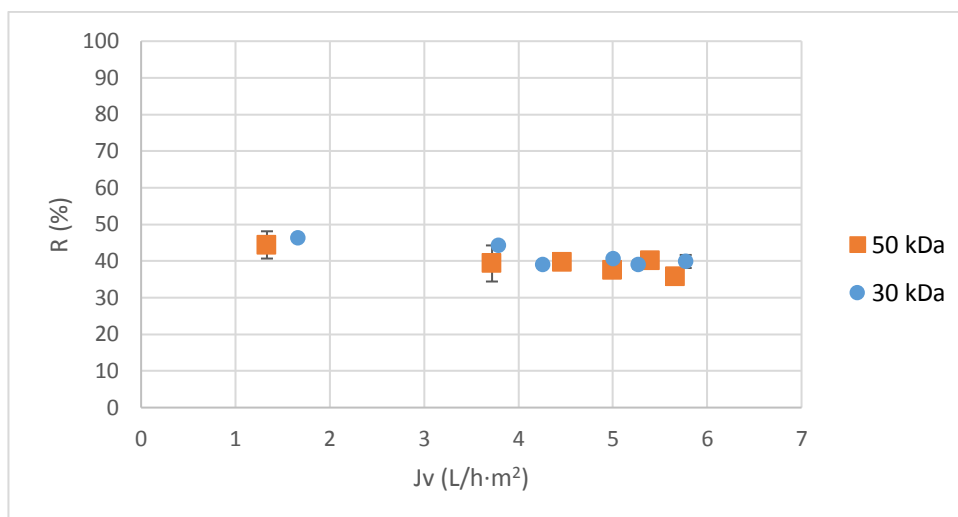


Figura 20. Porcentaje de rechazo de polifenoles totales en función del flujo de permeado para el extracto de orujo de aceite.

Paraskeva et al. (46) estudiaron la influencia de la temperatura y la TMP en el tratamiento de aguas residuales de la producción del aceite de oliva. A temperatura ambiente obtuvieron un porcentaje de rechazo de polifenoles totales del 63,2%, con un área efectiva de 0,24 m², un caudal de 4,3 m³/h y una concentración inicial de polifenoles de aproximadamente 824 mg/L. Estos resultados son superiores a los obtenidos en este trabajo, dónde el rechazo de polifenoles totales máximo para el extracto de orujo de aceite fue del 45%.

Si se estudian las concentraciones de polifenoles por familias en el extracto de lías de vino se obtienen los resultados expuestos en la Tabla 7. Ambas membranas presentan unos valores parecidos, rechazando más del 20% de la familia de los HB, más del 45% de los HC y más del 70% de los flavonoides. Por tanto, la corriente de rechazo es rica en flavonoides (alrededor del 72%), mientras que la corriente de permeado es rica en HB (78%) y HC (53%). Por estos motivos estas membranas consiguen separar los polifenoles por familias.

Tabla 7. Porcentaje de rechazo de polifenoles por familias para el extracto de lías de vino.

Membrana	Rechazo	Permeado
Filtros en formato de disco de 30 kDa	Hidroxibenzoicos: 20,5 ± 3,0% Hidroxicinámicos: 45,0 ± 4,2% Flavonoides: 71,5 ± 0%	Hidroxibenzoicos: 79,5% Hidroxicinámicos: 55,0% Flavonoides: 28,5%
Filtros en formato de disco de 50 kDa	Hidroxibenzoicos: 22,1 ± 7,2% Hidroxicinámicos: 47,5 ± 4,3% Flavonoides: 71,5 ± 0%	Hidroxibenzoicos: 77,9% Hidroxicinámicos: 52,5% Flavonoides: 28,5%

En el caso del extracto de orujo de aceite se obtienen los resultados representados en la Tabla 8. Ambas membranas tienen un comportamiento similar entre ellas, rechazando más del 20% de la familia de los HB, más del 45% de los HC y más del 71% de los flavonoides. Con este extracto no se consigue separar tan bien los polifenoles por familias en comparación con el extracto de lías de vino dado que la corriente de permeado está compuesta por 48% de flavonoides, 61% de HC y 73% de HB.

Tabla 8. Porcentaje de rechazo de polifenoles por familias para el extracto de orujo de aceite.

Membrana	Rechazo	Permeado
Filtros en formato de disco de 30kDa	Hidroxibenzoicos: $27,3 \pm 2,6\%$ Hidroxicinámicos: $39,1 \pm 4,2\%$ Flavonoides: $51,4 \pm 2,6\%$	Hidroxibenzoicos: 72,7% Hidroxicinámicos: 60,9% Flavonoides: 47,8%
Filtros en formato de disco de 50kDa	Hidroxibenzoicos: $23,7 \pm 6,3\%$ Hidroxicinámicos: $38,5 \pm 1,3\%$ Flavonoides: $43,2 \pm 3,1\%$	Hidroxibenzoicos: 76,3% Hidroxicinámicos: 61,5% Flavonoides: 56,8%

4.2.2. Nanofiltración (NF) y Ósmosis Inversa (OI)

Los procesos de nanofiltración y ósmosis inversa con el equipo memHPLC y los extractos objeto de estudio se realizaron en un trabajo previo (45). Los resultados obtenidos se adjuntan en el anexo A2 de este trabajo dado que se han tenido en cuenta para proponer el tren de membranas para cada extracto.

4.3. Propuesta de tren de membranas con el módulo memHPLC

Una vez obtenidos los resultados de las diferentes membranas en un sistema cerrado, se seleccionan las mejores para realizar un tren de membranas para cada extracto objeto de estudio. Cada paso del tren de membranas se realiza por duplicado y en abierto, es decir, sin recircular ni el permeado ni el rechazo.

4.3.1. Lías de vino

La configuración del tren de membranas está representada en la Figura 21 junto a los caudales y el volumen recogido de permeado en cada etapa del proceso, además en cada etapa del proceso se recogen muestras de permeado y rechazo para analizar su contenido de polifenoles con el fin de determinar la eficacia del sistema.

Los caudales de entrada para cada membrana se han determinado según los resultados obtenidos en el sistema en cerrado. Se han seleccionado siempre los caudales mínimos en los cuales el flujo de permeado haya alcanzado su máximo estable y también una base de cálculo para tratar 1L de extracto como se puede ver en la Figura 21.

La primera etapa del proceso consiste en una membrana de UF de 30 kDa, ésta es la membrana con mayor selectividad para el extracto de lías de vino, ya que es la que obtiene una mayor diferencia de porcentaje de rechazo entre familias. La corriente de rechazo de la UF, contiene un 72% de flavonoides y 45% de HC. Luego esta corriente se concentra con una membrana de OI, la BW30LE, debido al alto porcentaje de rechazo que presentó para todas las familias (ver anexo A2). Se escoge la membrana BW30LE en comparación con las otras dos membranas de OI estudiadas (XLE y SW30HR) debido a que, a pesar de tener los mismos porcentajes de rechazo, produce un mayor flujo de permeado.

Por otro lado, la corriente de permeado obtenido tras la etapa de UF (30 kDa), se trata con una membrana de NF DURACID. Se escoge esta membrana debido a su capacidad para separar las familias de HB e HC, las cuales tienen un porcentaje de rechazo del 55% y 78%, respectivamente. Para concentrar las corrientes de salida de la membrana DURACID (permeado y rechazo), se utilizan dos membranas de OI BW30LE para concentrar los polifenoles de cada corriente.

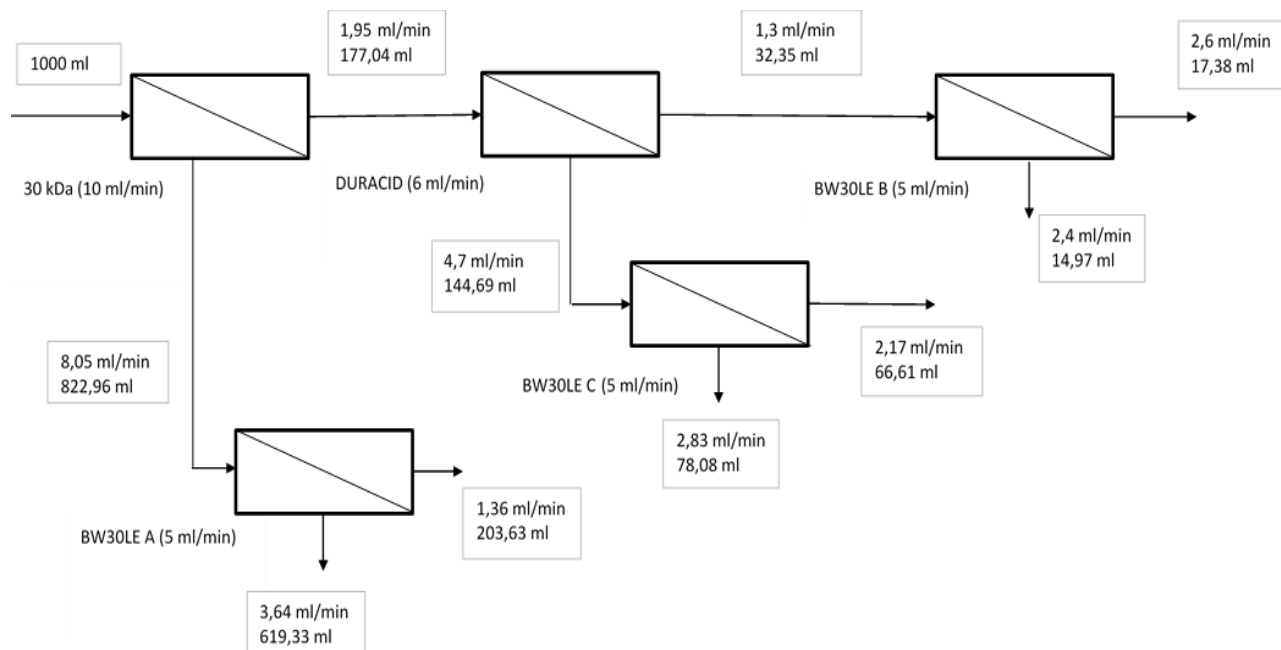


Figura 21. Tren de membranas de lías de vino, resultados de volumen y caudal final de cada etapa.

Los resultados obtenidos de caudales de permeado y rechazo no coinciden exactamente que en los ensayos en cerrado. Ésta diferencia puede ser causada por el hecho que en los ensayos individuales el extracto utilizado siempre es el mismo, mientras que, dentro del tren de membranas, el extracto va

variando a medida que se avanza. Además, el volumen de extracto tratado es mucho mayor en el caso del tren de membranas (1000 mL versus 30 mL en cerrado), acentuando los fenómenos producidos por el ensuciamiento de la membrana.

En la Figura 22 se resumen los resultados obtenidos de concentración de polifenoles por familias en todos los pasos del tren de membranas. Los resultados que contienen un asterisco, representan que la concentración obtenida está por debajo del límite de detección del equipo, y por tanto, el valor escrito no representa la concentración real, sino el límite de detección de dicha familia de polifenoles.

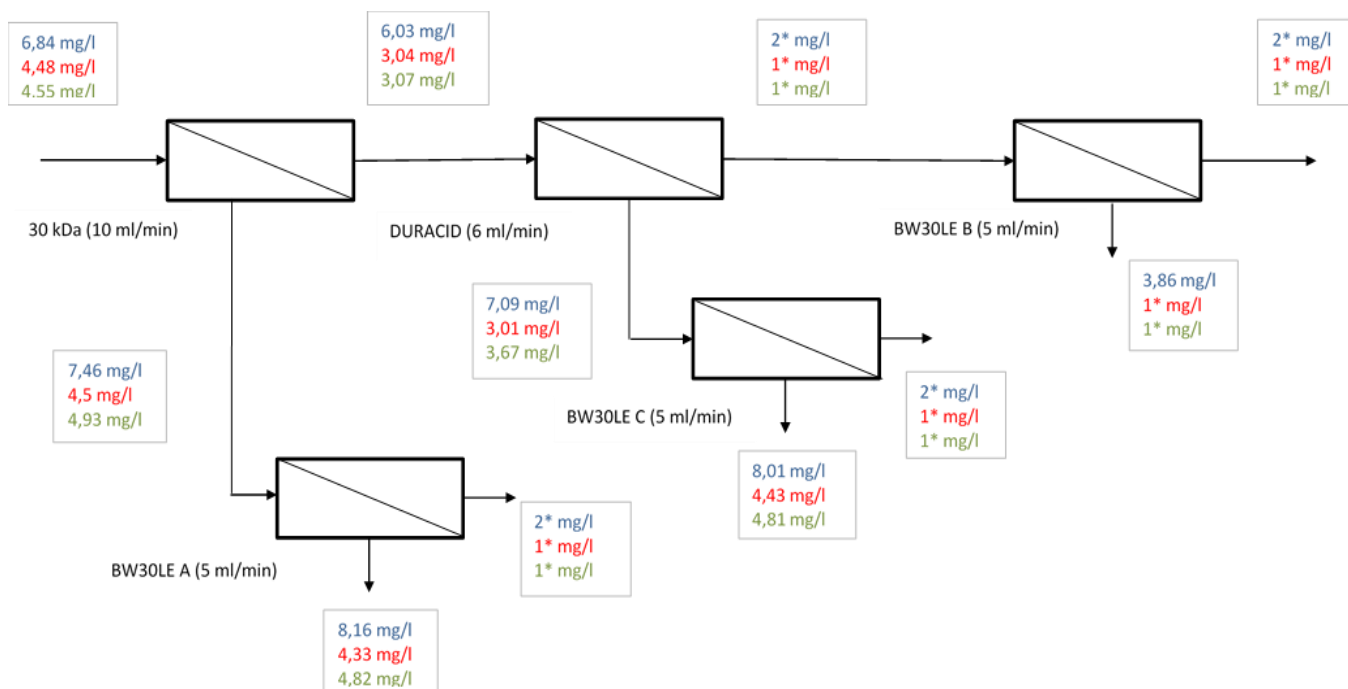


Figura 22. Tren de membranas de lías del vino con resultados de concentración. HB (azul), HC (rojo) y flavonoides (verde).

La concentración de polifenoles en la alimentación del tren de membranas es de 6,84 mg/L de HB, 4,48 mg/L de HC y 4,55 mg/L de flavonoides.

El primer proceso de membranas con la UF-30 kDa consigue aumentar la concentración de flavonoides en la corriente de rechazo en un factor 1,08 y la corriente de HB en un factor 1,1. Por otro lado, reduce la concentración de todas las familias en la corriente de permeado. La etapa de OI que sigue la corriente de rechazo de UF, consigue concentrar los polifenoles de la familia de los HB en un factor 1,1, al mismo tiempo, reduce ligeramente la concentración de las otras dos familias.

La etapa de NF que trata la corriente de permeado de la UF no separa las familias de polifenoles, sino que mantiene unas concentraciones similares a las iniciales, excepto en el caso de los flavonoides que aumenta ligeramente en un factor 1,2. La corriente de permeado contiene cantidades muy bajas de polifenoles puesto que están por debajo del límite de detección. El rechazo de la membrana de NF se

trata con una membrana de OI y se concentra en un factor de 1,1 para los HB, 1,5 para los HC y 1,3 para los flavonoides. Por otro lado, la corriente de permeado, también se trata con OI obteniendo un corriente de rechazo rico en HB, 3,86 mg/L, mientras que las otras dos familias permanecen por debajo del límite de detección.

En conclusión, el tren propuesto y estudiado para el extracto de lías de vino concentra los polifenoles y no consigue separarlos por familias. La etapa correspondiente a la membrana BW30LE A tiene un factor de concentración muy bajo, lo que supone un gasto innecesario de energía y material, y podría eliminarse. La etapa correspondiente a la membrana BW30LE B obtiene una corriente rica únicamente en polifenoles de la familia de los HB, lo cual es de gran interés. Las demás etapas del tren de membranas cumplen su función y consiguen concentrar los corrientes ricos en polifenoles. Como en el tren teórico planteado, se podrían añadir una etapa de cromatografía extractiva en las corrientes finales para obtener polifenoles puros como el ácido gálico, el ácido p-cumárico o la catequina.

Giacobo et al. (47) estudiaron un tren de membranas compuesto por membranas de MF, UF y NF para el tratamiento de un extracto de lías de vino en un módulo de membranas plano con área efectiva de 14,5 cm². Los resultados obtenidos muestran que durante la etapa de MF, llevada a cabo con una membrana de poliamida con tamaño de poro 0,4 µm (condiciones de trabajo: 25°C, 0,5 bares de TMP y caudal de 200 L/h), la corriente de rechazo obtenida es rica en partículas en suspensión, en cambio, la corriente de permeado utilizada como alimentación para el resto del proceso, tiene una concentración en polifenoles de 26,1 mg de GAE/L. Se estudiaron tres membranas, dos de UF (ETNA01PP y ETNA10PP) y una membrana de NF (NF270), todos los experimentos llevados a cabo con estas membranas se realizaron a un caudal de 150 L/h, manteniendo la temperatura de la alimentación a 25°C y aumentando la TMP de 3 bares hasta 5, 7 y 10 bares. Los porcentajes de rechazo de polifenoles obtenidos con las dos membranas de UF son similares, 61% (ETNA01PP) y 53,15% (ETNA10PP) a 15 bares, por otro lado la membrana de NF obtuvo un rechazo de polifenoles a la misma TMP de 95%. Con estos resultados se propuso un tren de membranas que cuenta con una etapa inicial de MF para eliminar partículas en suspensión, seguido de una etapa de UF para obtener un corriente de rechazo rico en polisacáridos, ya que ambas membranas presentaron una capacidad de separar los polifenoles de los polisacáridos, produciendo un rechazo superior al 70% y 50% respectivamente. Finalmente, el tren de membranas cuenta con una etapa de NF con la que se obtiene un corriente de rechazo rico en polifenoles.

4.3.2. Orujo de aceite

La configuración seleccionada para realizar el tren de membranas con el extracto de orujo de aceite está representada en la Figura 23 junto a los caudales y volúmenes recogidos en cada etapa.

De igual manera que con el extracto de lías de vino, los caudales de entrada de cada etapa se han determinado a partir de los resultados individuales en la configuración en cerrado.

La primera etapa del proceso es una membrana de UF de 30 kDa, al igual que con el extracto de lías de vino, esta membrana permite separar los polifenoles por familias, aunque con el extracto de orujo de aceite no es tan selectiva.

Tanto el rechazo como el permeado de este primer proceso, se tratan con una membrana de NF, la NF270, que tiene un alto porcentaje de rechazo en flavonoides (90%), además la diferencia con las otras membranas de NF es que tiene el porcentaje más elevado de HB en su permeado (37%) por encima de las otras membranas como TFCS y DURACID (27%), NF90 (22,5%) y TFC-HR (18%), esto significa que existe una mayor separación entre ambas familias. Finalmente, para tratar todas las corrientes de salida de los procesos de NF, se escoge la membrana de OI BW30LE, al igual que con el extracto de lías de vino, ya que permite concentrar todas las familias de polifenoles.

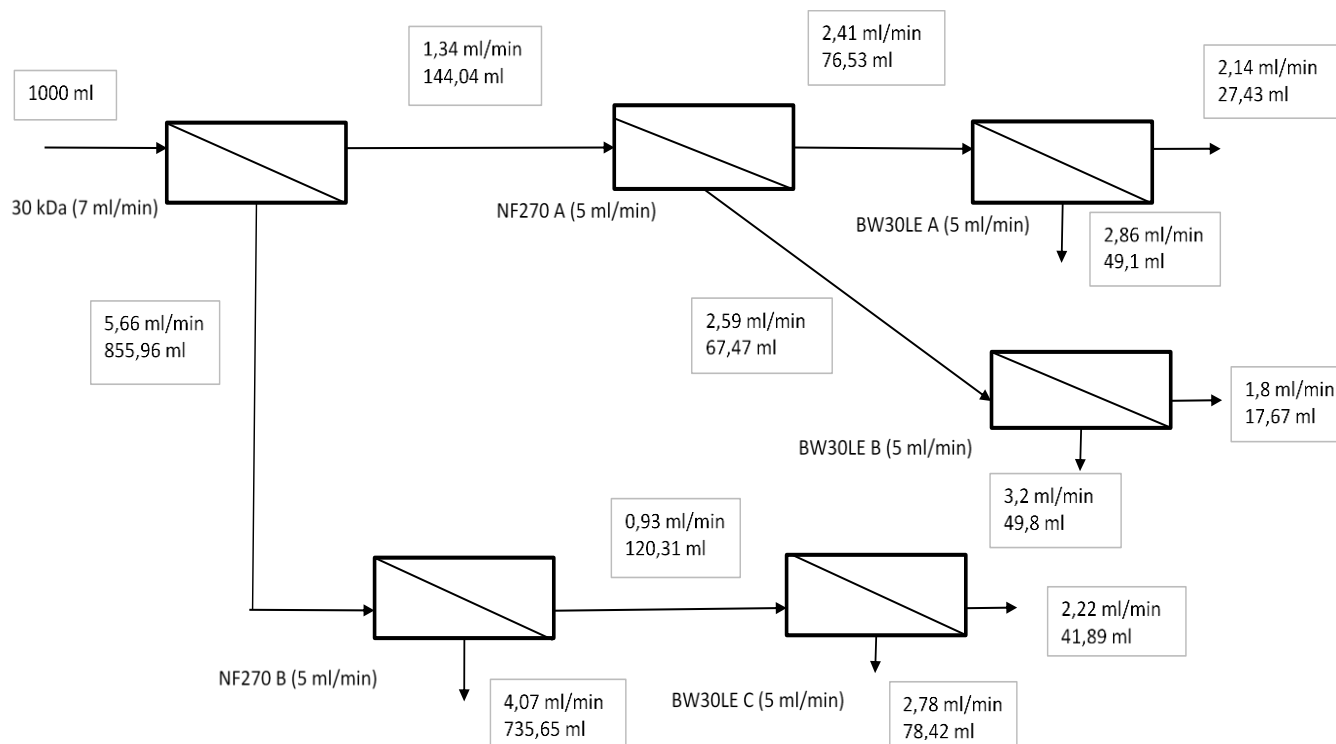


Figura 23. Tren de membranas de orujo de aceite, resultados de volumen y caudal en cada etapa.

Los resultados de caudales y volúmenes durante la realización del experimento en abierto, han presentado la misma tendencia que con el tren de membranas para las lías, alejándose de los valores obtenidos en la realización del experimento en cerrado y de manera individual.

En la Figura 24 se resumen los resultados de concentración de polifenoles por familias obtenidos en el tren de membranas.

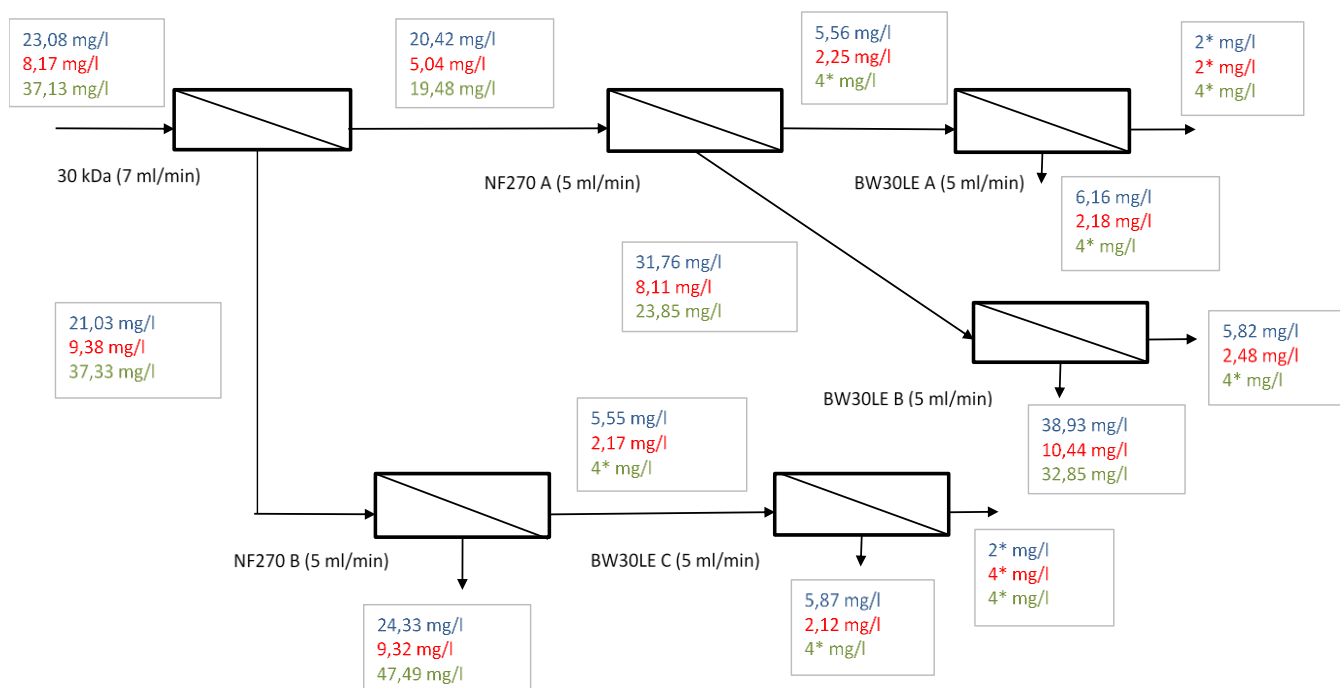


Figura 24. Tren de membranas de orujo de aceite con resultados de concentración. HB (azul), HC (rojo) y flavonoides (verde).

La concentración de la alimentación en el tren de membranas es de $23,1 \pm 1,7$ mg/L de HB, $8,2 \pm 1,4$ mg/L de HC y $37,1 \pm 0,5$ mg/L de flavonoides.

En la primera etapa de UF, la concentración de HB se mantiene similar tanto en el permeado como en el rechazo. Por otro lado, las otras dos familias (HC y flavonoides) se quedan en mayor parte en la corriente de rechazo, siendo la concentración de éstas prácticamente el doble que en la corriente de permeado.

Los dos procesos de NF consiguen concentrar las tres familias de polifenoles. En el caso de la membrana NF270 A, concentra los HB e HC en un factor de 1,6, mientras que los flavonoides se concentran en un factor de 1,2. Las corrientes de salida (permeado y rechazo) de esta membrana son tratadas mediante membranas de OI, la BW30LE. Ambas membranas concentran las tres familias de polifenoles ligeramente en su corriente de rechazo, mientras que la corriente de permeado presenta unas concentraciones por debajo o ligeramente por encima del límite de detección de polifenoles.

El permeado obtenido tras el tratamiento con la membrana NF270 B, es tratado con una membrana de OI, la BW30LE C. Los resultados son similares a los obtenidos por la membrana BW30LE A, debido a que tratan un corriente con concentraciones muy parecidas.

Como conclusión, la primera etapa de UF separa dos de las familias de polifenoles, los HB de los flavonoides, y es útil para su tratamiento. Las etapas de NF concentran todas las familias de polifenoles con un factor de concentración promedio de $1,3 \pm 0,23$. Las membranas de OI, en los procesos de BW30LE A y BW30LE C, tratan pequeñas cantidades de muestra con bajas concentraciones de polifenoles, debido a que reciben las corrientes de permeado de las etapas de NF, por tanto, son innecesarias. Una etapa adicional de OI, con la membrana BW30LE, para tratar la corriente de rechazo de la membrana NF270 B serviría para concentrar las familias de esta corriente, obteniendo un factor de concentración adicional de $1,3 \pm 0,08$ para todas las familias. Adicionalmente, se podría añadir una etapa de cromatografía extractiva para separar los polifenoles de manera individual y obtener estos compuestos puros.

Russo et al. (48) realizó un estudio para la elaboración de un tren de membranas, compuesto por etapas de MF (con membranas de tamaño de poro de 0,8 y 0,45 μm y área 0,35 m^2), UF (con membranas poliméricas de 1, 6, 20 y 80 kDa y área efectiva de 5 m^2) y OI (con una membrana de poliamida compuesta en espiral y área efectiva de 7 m^2) para la recuperación de polifenoles de aguas residuales del proceso de producción de la oliva. La concentración inicial de polifenoles en la alimentación es de 3-11 g/L con un pH entre 4,5 y 6. Excepto la membrana de OI, todas las demás provocaban una disminución de la concentración de polifenoles en el permeado, al igual que en el estudio de este proyecto. La primera etapa del proceso consiste una MF para eliminar las partículas en suspensión que se puedan encontrar en la muestra, la concentración en polifenoles pasa de 55,38 mg/L a 349,18 mg/L. El permeado de la etapa de MF es tratado entonces con dos etapas consecutivas de UF, primero con la membrana de 6 kDa (230,4 mg/L de polifenoles totales) y el permeado de esta etapa con la membrana de 1 kDa (134,9 mg/L de polifenoles totales). Finalmente, se trata el permeado de la etapa anterior mediante una membrana de OI, obteniéndose una corriente con 464,9 mg/L de polifenoles. También observaron al estudiar las membranas de UF, que no existían diferencias entre ellas, escogiéndose la más adecuada según flujo de permeado y mayor rechazo de polifenoles, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo.

4.4. Planta plana con membranas de nanofiltración

Para comprobar la relación entre la TMP y el flujo de permeado se han graficado estos valores con las membranas DURACID y NF90 y el extracto de lías de vino. Se observa como existe una relación lineal dónde al aumentar la TMP aumenta también el flujo de permeado, esta relación varía según la naturaleza de la membrana. En la siguiente Figura 25 se puede observar esta relación.

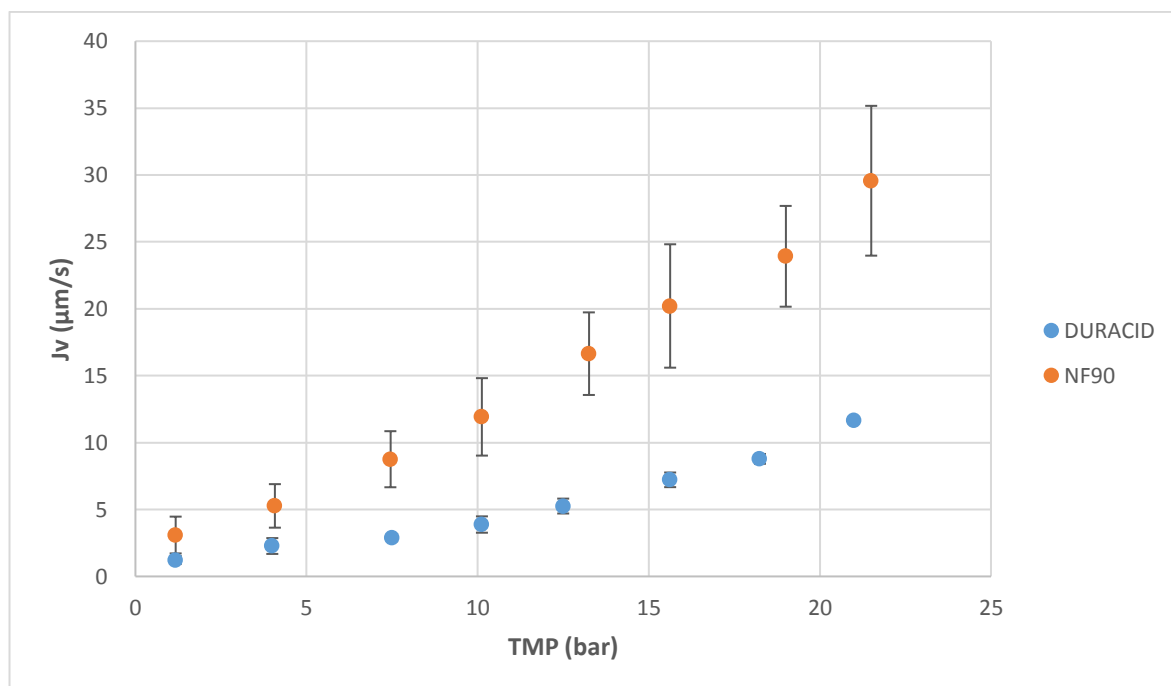


Figura 25. Flujo de permeado en función de la TMP.

En el caso de la membrana DURACID el flujo de permeado aumenta desde $1,23 \pm 0,3 \mu\text{m/s}$ hasta $11,66 \pm 0,13 \mu\text{m/s}$ en el intervalo de 1 a 22 bares de TMP. Por otro lado, la membrana NF90 en el mismo intervalo de presiones aumenta su flujo de permeado desde $3,09 \pm 1,37 \mu\text{m/s}$ hasta $29,57 \pm 5,6 \mu\text{m/s}$. Los datos obtenidos con la membrana NF90 son más dispersos que los obtenidos con la membrana DURACID, a pesar de eso, se puede observar cómo el extracto muestra mayor facilidad al pasar a través de la membrana NF90, por el contrario, la membrana DURACID necesita un aumento significativo en la TMP para aumentar el flujo de permeado que pasa a través de ella.

El rechazo obtenido de polifenoles totales con las diferentes membranas y el extracto de lías de vino ha resultado ser muy elevado: se observa como a flujos de permeado bajos el porcentaje de rechazo disminuye y al contrario, si se aumenta el flujo de permeado el porcentaje de rechazo aumenta hasta llegar a un rechazo máximo que se mantiene estable por más que se aumenta el flujo de permeado y por tanto la TMP. En la Figura 26 están representados los valores experimentales obtenidos.

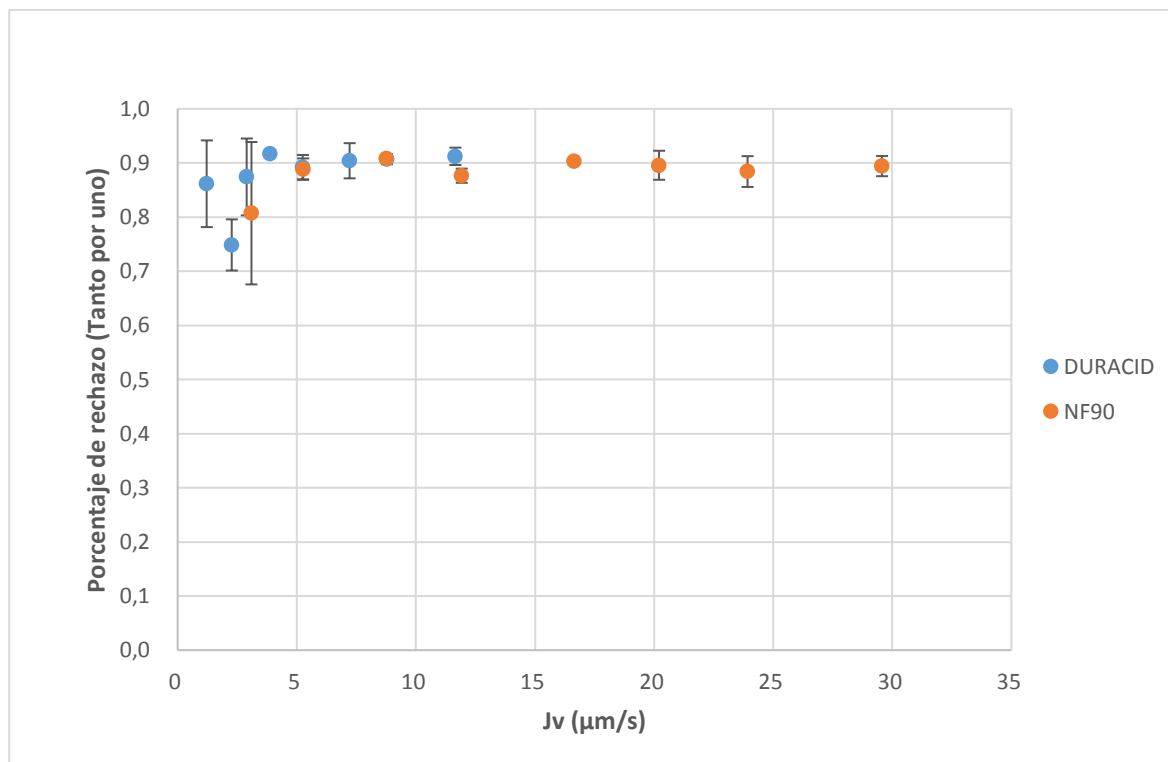


Figura 26. Porcentaje de rechazo de polifenoles totales en función del flujo de permeado.

El rechazo de polifenoles totales máximos obtenidos por la membrana DURACID es de $91,71 \pm 0,5\%$ a un flujo de $3,88 \mu\text{m/s}$ (10 bares de TMP) manteniéndose estable hasta el flujo máximo de $11,67 \mu\text{m/s}$ a 22 bares de TMP. El rechazo promedio obtenido en el rango de estudio es de $87,4 \pm 5,5\%$.

Por otro lado, la membrana NF90 presenta un rechazo total máximo de $90,84 \pm 0,43\%$ a un flujo de permeado de $8,75 \mu\text{m/s}$ (7 bares de TMP). A partir de los 4 bares de TMP, a un flujo de permeado de $5,27 \mu\text{m/s}$ el rechazo se mantiene estable, en un 90% aproximadamente, hasta el flujo máximo de $29,57 \mu\text{m/s}$ a 22 bares de TMP. El rechazo promedio obtenido en el rango de estudio es de $88,1 \pm 4,0\%$.

Es importante tener en cuenta la relación entre la TMP y el flujo de permeado, la membrana NF90 obtiene valores de rechazo similares a la membrana DURACID pero con mayores flujos de permeado a la misma TMP, es decir, tratando un mayor caudal de muestra. Además, los rechazos totales de polifenoles para ambas membranas han resultado ser más elevados que los obtenidos previamente con el módulo memHPLC (alrededor del 80% en la membrana NF90 y 70% en la membrana DURACID).

Se ha realizado un estudio de la separación por familias en todas las membranas utilizadas. Esto permite comprobar la capacidad de separación y/o concentración de los polifenoles por las membranas. Los resultados han indicado un comportamiento similar entre las membranas DURACID y NF90, ambas membranas separan la totalidad de las familias de polifenoles HC y HB por debajo del límite de detección del HPLC. En la siguiente Figura 27 se puede comprobar los resultados obtenidos.

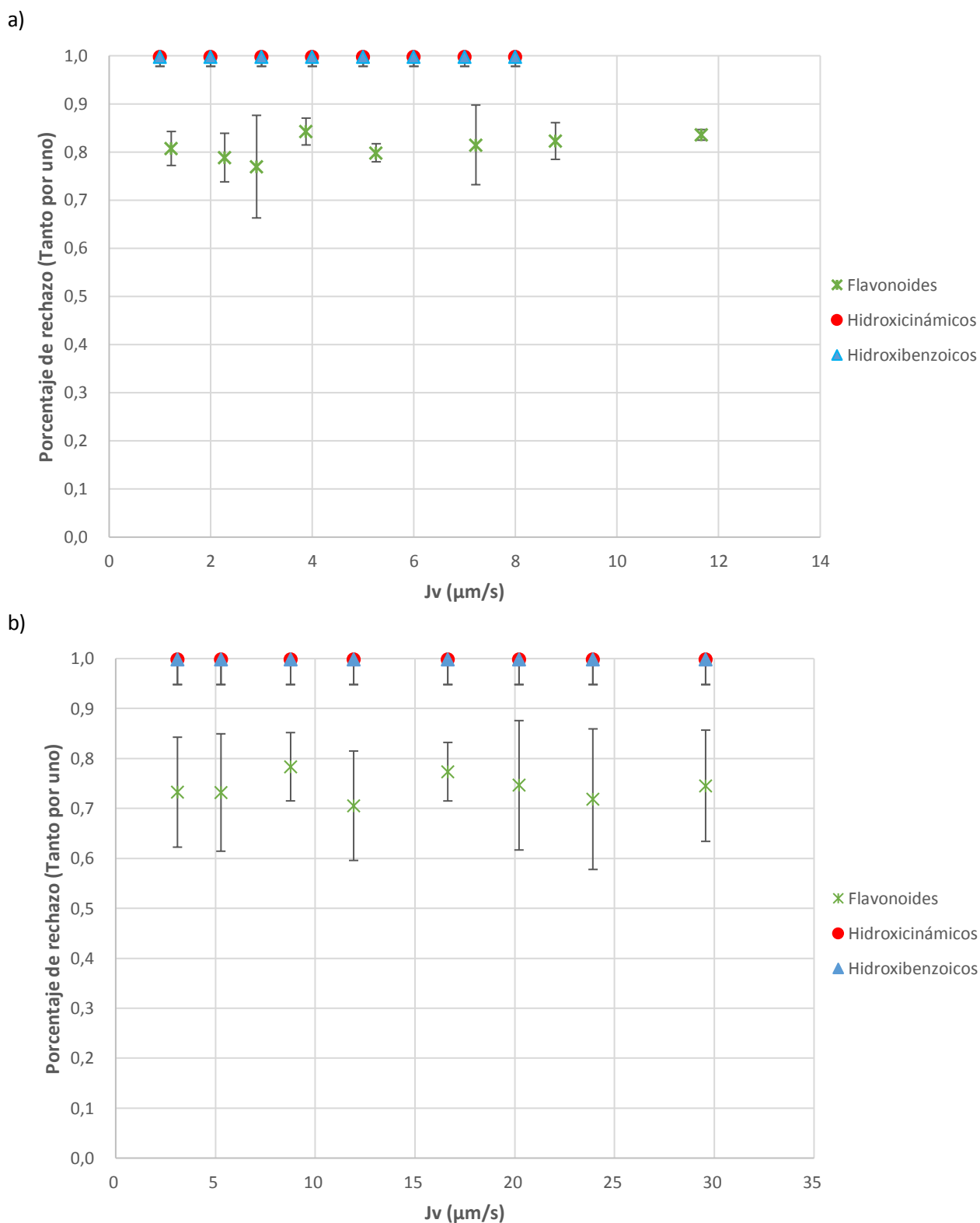


Figura 27. Porcentaje de rechazo por familias de polifenoles en función del flujo de permeado para la membrana a) DURACID y b) NF90, respectivamente.

En ambos casos las membranas concentran las familias de HC y HB en su totalidad debido a su alto porcentaje de rechazo ($> 99\%$). Respecto a la familia de los flavonoides, ambas membranas concentran los polifenoles principalmente, aunque ambas membranas tienen una cierta selectividad para dejar pasar parte de los flavonoides a través de la membrana, siendo la membrana NF90 la más selectiva de las dos.

La membrana DURACID registra un rechazo promedio de flavonoides del $81,2 \pm 2,5\%$ con un máximo de $84,23 \pm 2,78\%$ de rechazo a un flujo de $3,88 \mu\text{m/s}$, correspondiente a una TMP de 10 bares, que concuerda con las condiciones dónde se registra un rechazo total de polifenoles más elevado.

Por otro lado, la membrana NF90 presenta unos valores medios de rechazo menores, $74,1 \pm 2,6\%$ con un máximo de rechazo de flavonoides de $78,45 \pm 6,9\%$ a un flujo de permeado de $8,76 \mu\text{m/s}$, correspondiente a una TMP de 7 bares, igual que en el caso de la membrana DURACID, estos valores máximos coinciden con las condiciones en las que se registra el rechazo más alto de polifenoles totales

Si se comparan los resultados obtenidos de la planta plana y el módulo memHPLC, adjuntos en el anexo A, con membranas de nanofiltración, se puede observar que el rechazo de los flavonoides es similar en el caso de la membrana NF90, 71,5% de rechazo (versus 74%), y un 10% menor en el caso de la membrana DURACID (81% versus 69.5%). En cuanto a las otras dos familias, los resultados obtenidos son diferentes, puesto que en el caso de la planta plana se obtiene un rechazo de aproximadamente el 100%, en cambio, para el módulo memHPLC, los rechazos se sitúan alrededor del 71% para los HC y del 50% para los HB.

Giacobbo et al. (25) obtuvieron unos resultados similares a los obtenidos con la planta plana, utilizaron una membrana NF270, a temperatura ambiente (25°C), 15 bares de TMP y $14,5 \text{ cm}^2$ de área efectiva. En estas condiciones el rechazo total de polifenoles fue de 94,7%, en comparación al 91,71% obtenido con la membrana DURACID a 10 bares de TMP y 90,84% con la membrana NF90 a 7 bares de TMP.

Análisis del impacto ambiental

Este proyecto está enfocado en la revalorización y reutilización de residuos agroalimentarios generados por las industrias del vino y del aceite de oliva, los cuales hasta ahora eran desaprovechados o se utilizaban para la generación de energía o compostaje. Por tanto, la esencia del trabajo está centrada en la consciencia medioambiental, la sostenibilidad de la industria y la circularidad de los procesos de producción actuales. La idea global de este trabajo, que engloba el aprovechamiento de residuos agroalimentarios así como el concepto de economía circular, se muestra en la Figura 28, donde se puede apreciar en qué punto (la revalorización de residuos) del proceso industrial se aplicarían los conceptos estudiados en este trabajo, para de esta manera obtener una materia prima de interés (polifenoles) para su posterior aplicación en diferentes industrias, como la farmacéutica o la cosmética.

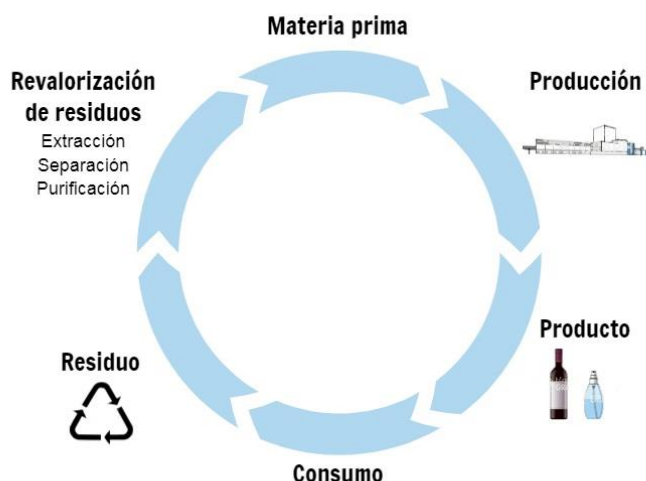


Figura 28. Esquema reaprovechamiento de residuos agroalimentarios.

El estudio realizado se ha centrado en pequeña escala (113 cm²) y mediana escala (140 cm²) dentro del laboratorio, estudiando nuevas rutas de tratamiento de los residuos como son los trenes de membranas para la separación y/o concentración de los extractos y posterior incorporación de nuevos procesos de intercambio iónico con resinas o la cromatografía extractiva como etapas final de purificación para ver su aplicabilidad futura en modelos de tratamiento industriales.

Por otro lado, aunque a lo largo del trabajo se intentó minimizar la producción de residuos, durante las diferentes etapas del experimento, como son la extracción y la posterior separación de los polifenoles mediante tecnologías de membranas, se han generado residuos sólidos como es el caso de los guantes, pipetas *pasteur*, puntas de pipetas, membranas, papel absorbente o envases de plástico como los

tubos *falcon*. Todos los residuos anteriormente mencionados son sólidos y por tanto se gestionaron en el contenedor de sólidos absorbentes contaminantes.

También se han generado residuos líquidos a la hora de eliminar el agua de limpieza de los procesos de membranas. El resto de líquidos y extractos se han conservado en la nevera o congelador dependiendo de las circunstancias. Los residuos líquidos anteriormente mencionados son disoluciones compuestas mayoritariamente por agua y una pequeña cantidad diluida de compuestos orgánicos como los polifenoles o los carbohidratos, por este motivo se pueden desechar por el desagüe del laboratorio. También se llevó a cabo una limpieza de la planta plana con agua y una pequeña cantidad de ácido clorhídrico para eliminar posibles restos de experimentos anteriores antes de empezar este estudio, esta agua ácida se gestionó en el bidón de soluciones ácidas.

Conclusiones

La extracción de polifenoles mediante la técnica de maceración ha permitido obtener extractos con una amplia variedad de polifenoles, se han obtenido polifenoles correspondientes a las familias de hidroxibenzoicos, hidroxicinámicos y flavonoides. En el caso de las muestras de orujo de aceite han presentado una mayor concentración, alrededor de 173 mg/L, que las obtenidas a partir de lías de vino, sobre 33 mg/L.

Con el módulo a pequeña escala (113 cm²), memHPLC, las membranas de UF presentan una capacidad de separación de polifenoles para el extracto de lías del vino, mientras que para el extracto de orujo de aceite no son tan efectivas. La membrana con mayor capacidad para separar polifenoles es la membrana de UF de 30 kDa, con un 41,8% de rechazo.

Con los resultados experimentales obtenidos y con la ayuda de los datos de un estudio previo (45) se ha conseguido plantear un tren de membranas para cada extracto estudiado. Los resultados obtenidos han permitido plantear una serie de mejoras, eliminando o añadiendo etapas para ajustar el sistema a los resultados esperados. Gracias al estudio bibliográfico realizando en el capítulo de estado del arte, se podrían sustituir o añadir algunas etapas de tratamiento con resinas o cromatografía extractiva, con el fin de mejorar la separación de polifenoles o purificar un polifenol de manera individual.

Finalmente, con el escalado realizado en la planta de plana (140 cm²), con las membranas de nanofiltración (DURACID y NF90) y el extracto de lías de vino, se obtienen unos resultados parecidos a los obtenidos con el módulo memHPLC; aunque los resultados del escalado indican mayor rechazo total (alrededor del 88% para ambas membranas, mientras que el módulo memHPLC obtiene un 70% para la membrana DURACID y un 80% para la NF90) y mayor rechazo por familias, el rechazo en la planta plana es aproximadamente del 100% en las familias de HB y HC, en cambio en el módulo memHPLC para los HB es del 50 % y para los HC del 71 %. Para la familia de flavonoides, los porcentajes de rechazo se mantienen constantes para la membrana NF90, 71,5 % en la planta plana y 74 % en el módulo memHPLC, y ligeramente superiores en la membrana DURACID, 81 % en la planta plana y 61,5 % en el módulo memHPLC.

Análisis Económico

En este apartado se incluye un análisis económico del proyecto, incluyendo los costes del material utilizado, teniendo en cuenta la vida útil de los equipos y el tiempo de uso, costes energéticos y costes de personal desglosados en diferentes apartados.

Coste del material de laboratorio utilizado

En la Tabla 9 se muestran los costes de los reactivos utilizados (49)(50):

Tabla 9. Costes de reactivos.

Reactivo	Cantidad (l)	Precio(€/L)	Coste (€)
Agua Milli-Q	50	1	50
Agua destilada	30	1	30
Etanol	0,2	39,10	7,82
HCl	0,08	31,80	2,54
Acetonitrilo	3	90,76	272,28
Subtotal			362,64

En esta Tabla 10 están representados los costes de los equipos utilizados para la realización de los experimentos (49)(51).

Tabla 10. Costes del equipo.

Equipo	Coste inicial (€)	Vida útil (años)	Tiempo de uso (años)	Coste (€)
Extracción de polifenoles				
Balanza analítica	1420	10	0,022	3,13
Centrifugadora	4389	10	0,012	5,26
Placa calefactora y agitadora	376	8	0,003	0,14

Procesos de membranas con el equipo memHPLC				
Bomba de alta presión	3500	10	0,024	8,40
Módulo de membranas memHPLC	3465	5	0,024	16,63
Spacers	1386,60	3	0,011	1,15
Procesos de membranas con la planta plana				
Bomba Hydra-Cell G10	3616	8	0,011	4,97
Módulo membranas planta plana	5338,20	8	0,011	7,34
Termostato DIGIT-COOL	2184,60	8	0,018	4,91
Tubo PVC	7	5	0,011	0,02
Tubo de acero inoxidable	36	8	0,011	0,05
Tanque de 30l	185,35	8	0,018	0,42
Spacers	1386,60	2	0,011	0,76
Válvula by-pass	268,80	8	0,011	0,37
Válvula de aguja	78,20	8	0,011	0,11
Manómetros	66	8	0,011	0,09
Bomba de mano	666,7	8	0,055	0,92
Caudalímetro	476	8	0,011	0,66

Porta filtro	26,70	8	0,011	0,04
Filtro	5,10	1	0,011	0,06
Ordenador	725	5	0.011	1,60
pH-metro	339,94	8	0,011	0,47
Conductivimetro	513,04	8	0,011	0,71
Variador de frecuencia	486,80	8	0,011	0,67
Determinación de polifenoles				
HPLC	49600	10	0,026	128,96
			Subtotal	187,85

Finalmente, en la Tabla 11 se exponen los costes del material de laboratorio incluyendo las membranas (49):

Tabla 11. Costes del material.

Material	Unidades utilizadas (u)	Precio unitario (€/u)	Coste (€)
Filtros en formato de disco de 30kDa	6	29,40	176,40
Filtros en formato de disco de 50kDa	4	29,40	117,60
Membrana DURACID	6	26,30	157,80
Membrana NF90	5	26,30	131,50
Membrana NF270	7	20,70	144,90
Membrana BW30LE	12	26,30	315,60
Tubos <i>falcon</i> 30ml	240	0,34	81,60

Pipeta Pasteur	30	0,02	0,60
Vaso de precipitados 50ml	1	19,00	19,00
Vaso de precipitados de 2500ml	2	19,50	19,50
Puntas de pipetas	520	0,05	26
Cristal de reloj	2	7,75	15,50
Imán de laboratorio	2	2,75	5,50
Matraz aforado 500ml	2	10,18	20,36
Tubos Eppendorf	600	0,37	222
Viales cromatografía	620	0,22	136,40
Espátula	1	4,95	4,95
Botellas de 1l	12	2,39	28,68
Guantes	50	0,07	3,50
Subtotal			2065,79

Coste energético

Para el coste energético del proyecto se han tenido en cuenta los costes eléctricos (51)(52)(53) que supone el funcionamiento de la bomba Hydra-Cell y el HPLC, no se ha tenido en cuenta el consumo eléctrico de los otros equipos utilizados por su bajo coste.

Tabla 12. Costes energéticos.

Equipo	Consumo eléctrico (kW)	Horas de ftrabajo (h)	Precio (€/kWh)	Coste (€)
Bomba Hydra-Cell	0,215	90	0,1060	2,05

HPLC Agilent serie 1100	0,085	200	0,1060	1,80
			Subtotal	3,85

Coste personal

El coste personal (54) para realizar la parte experimental, redactar la memoria del proyecto y la supervisión de un ingeniero *senior* está desglosado en la Tabla 13:

Tabla 13. Costes de personal.

Concepto	Tiempo invertido (h)	Sueldo (€/h)	Coste (€)
Búsqueda y lectura bibliográfica	130	14	1820
Formación	22	14	308
Experimentación en el laboratorio	220	14	3080
Tratamiento de resultados	85	14	1190
Redacción de la memoria	160	14	2240
Dirección del proyecto	80	44	2800
		Subtotal	11438

Coste total del proyecto

Finalmente, en la Tabla 14 se muestran un resumen de todos los apartados anteriores y el coste global del proyecto:

Tabla 14. Costes globales del proyecto.

Tipo de coste	Concepto	Coste (€)
Material	Reactivos	362,64
	Equipos	187,85
	Material de laboratorio	2065,79
Energético	Total	2,29
Personal	Total	11438
	Coste total del proyecto	14056,57

Bibliografia

1. (CAR/PL). Prevención de la contaminación en la producción de aceite de oliva. A: *Centro de Actividades Regionales para la Producción Limpia (CAR/PL)*. 2000, p. 138.
2. Cassano, A. et al. Effect of polyphenols-membrane interactions on the performance of membrane-based processes. A review. A: *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V., 2017, Vol. 351, p. 45-75. ISSN 00108545. DOI 10.1016/j.ccr.2017.06.013.
3. Stahel, W.R. Circular economy - a comment. A: *Nature* [en línea]. 2016, p. 6-9. Disponible a: https://www.nature.com/polopoly_fs/1.19594!/menu/main/topColumns/topLeftColumn/pdf/531435a.pdf.
4. Haas, W. et al. How circular is the global economy?: An assessment of material flows, waste production, and recycling in the European union and the world in 2005. A: *Journal of Industrial Ecology*. 2015, Vol. 19, núm. 5, p. 765-777. ISSN 15309290. DOI 10.1111/jiec.12244.
5. Prof. Stéphane Quideau, Dr. Denis Deffieux, Dr. Céline Douat-Casassus, D.L.P. *Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis* [en línea]. 2011. 2011. Disponible a: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201000044>.
6. Bazinet, L. i Doyen, A. Antioxidants, mechanisms, and recovery by membrane processes. A: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [en línea]. Taylor & Francis, 2017, Vol. 57, núm. 4, p. 677-700. ISSN 15497852. DOI 10.1080/10408398.2014.912609. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2014.912609>.
7. Vita, J.A. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. A: *The American journal of clinical nutrition*. 2005, Vol. 81, núm. 1 Suppl, p. 292-297. ISSN 00029165. DOI 10.1093/ajcn/81.1.292s.
8. Nakajima, D. et al. Suppressive effects of genistein dosage and resistance exercise on bone loss in ovariectomized rats. A: *Journal of Physiological Anthropology and Applied Human Science*. 2001, Vol. 20, núm. 5, p. 285-291. ISSN 13453475. DOI 10.2114/jpa.20.285.
9. Ibrahim, S. i Mishra, N. Anti-oxidant Effect of Quercetin on Type 2 Diabetic Erythrocytes. A: *Journal of Food Biochemistry*. 2009, Vol. 33, núm. 3, p. 404-415.
10. Pawan Kumar Maurya, S.I.R. Protective role of tea catechins on erythrocytes subjected to oxidative stress during human aging. A: *Natural Product Research*. 2009, Vol. 23, núm. 12, p. 1072-1079.
11. Naghma, Khan, Hasan, M. Multitargeted therapy of cancer by green tea polyphenols. A: *Cancer Letters*. 2008, Vol. 269, núm. 2, p. 269-280.
12. Dai, Q. et al. Fruit and Vegetable Juices and Alzheimer's Disease: The Kame Project. A: *The American Journal of Medicine*. 2006, Vol. 119, núm. 9, p. 751-759.
13. Saleem, M. et al. An update on bioactive plant lignans. A: *Natural Product Reports*. 2005, núm. 6, p. 2000-2004.

14. Organización Internacional de la Viña y el Vino. A: *13 de Julio* [en línea]. 2019. [Consulta: 2 abril 2020]. Disponible a: <http://www.oiv.int/es/actualidad-de-la-oiv/balance-2019-de-la-oiv-sobre-la-situacion-vitivinicola-mundial>.
15. Beres, C. et al. Towards integral utilization of grape pomace from winemaking process: A review. A: *Waste Management* [en línea]. Elsevier Ltd, 2017, Vol. 68, p. 581-594. ISSN 18792456. DOI 10.1016/j.wasman.2017.07.017. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2017.07.017>.
16. Devesa-Rey, R. et al. Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. A: *Waste Management* [en línea]. Elsevier Ltd, 2011, Vol. 31, núm. 11, p. 2327-2335. ISSN 0956053X. DOI 10.1016/j.wasman.2011.06.001. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2011.06.001>.
17. Teixeira, A. et al. Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. A: *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, Vol. 15, núm. 9, p. 15638-15678. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms150915638.
18. Dermeche, S. et al. Olive mill wastes: Biochemical characterizations and valorization strategies. A: *Process Biochemistry* [en línea]. Elsevier Ltd, 2013, Vol. 48, núm. 10, p. 1532-1552. ISSN 13595113. DOI 10.1016/j.procbio.2013.07.010. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.07.010>.
19. Patra, J.K. et al. Selected commercial plants: A review of extraction and isolation of bioactive compounds and their pharmacological market value. A: *Trends in Food Science and Technology* [en línea]. Elsevier, 2018, Vol. 82, núm. October, p. 89-109. ISSN 09242244. DOI 10.1016/j.tifs.2018.10.001. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.10.001>.
20. Zhang, Q.W., Lin, L.G. i Ye, W.C. Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. A: *Chinese Medicine (United Kingdom)* [en línea]. BioMed Central, 2018, Vol. 13, núm. 1, p. 1-26. ISSN 17498546. DOI 10.1186/s13020-018-0177-x. Disponible a: <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>.
21. Safdar, M.N. et al. Extraction and quantification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. A: *Journal of Food and Drug Analysis* [en línea]. Elsevier Ltd, 2017, Vol. 25, núm. 3, p. 488-500. ISSN 10219498. DOI 10.1016/j.jfda.2016.07.010. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2016.07.010>.
22. Ćujić, N. et al. Optimization of polyphenols extraction from dried chokeberry using maceration as traditional technique. A: *Food Chemistry*. 2016, Vol. 194, p. 135-142. ISSN 18737072. DOI 10.1016/j.foodchem.2015.08.008.
23. Jovanović, A.A. et al. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. A: *Separation and Purification Technology*. 2017, Vol. 179, p. 369-380. ISSN 18733794. DOI 10.1016/j.seppur.2017.01.055.
24. Cassano, A. et al. Nanofiltration and tight ultrafiltration membranes for the recovery of polyphenols from agro-food by-products. A: *International Journal of Molecular Sciences*. 2018, Vol. 19, núm. 2. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms19020351.
25. Giacobbo, A. et al. Concentration polarization in ultrafiltration/nanofiltration for the recovery of polyphenols from winery wastewaters. A: *Membranes*. 2018, Vol. 8, núm. 3. ISSN 20770375. DOI 10.3390/membranes8030046.

26. Conidi, C. et al. Separation and purification of phenolic compounds from pomegranate juice by ultrafiltration and nanofiltration membranes. A: *Food Eng.* 2017, núm. 195, p. 1-13.
27. Cissé, M. et al. Selecting ultrafiltration and nanofiltration membranes to concentrate anthocyanins from roselle extract (*Hibiscus sabdariffa* L.). A: *Food Res. Int.* 2011, Vol. 44, núm. 9, p. 2607-2614.
28. Avram, A.M. et al. Concentrations of polyphenols from blueberry pomace extract using nanofiltration. A: *Food and Bioprocesses Processing* [en línia]. Institution of Chemical Engineers, 2017, Vol. 106, p. 91-101. ISSN 09603085. DOI 10.1016/j.fbp.2017.07.006. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2017.07.006>.
29. De Santana Magalhães, F. et al. Recovery of phenolic compounds from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit extract by membrane filtrations: Comparison of direct and sequential processes. A: *Journal of Food Engineering* [en línia]. Elsevier, 2019, Vol. 257, núm. October 2018, p. 26-33. ISSN 02608774. DOI 10.1016/j.jfoodeng.2019.03.025. Disponible a: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.03.025>.
30. Ioannou, L.A. et al. Winery wastewater purification by reverse osmosis and oxidation of the concentrate by solar photo-Fenton. A: *Separation and Purification Technology* [en línia]. Elsevier B.V., 2013, Vol. 118, p. 659-669. ISSN 13835866. DOI 10.1016/j.seppur.2013.07.049. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2013.07.049>.
31. Gunathilake, K.D.P.P., Yu, L.J. i Rupasinghe, H.P.V. Reverse osmosis as a potential technique to improve antioxidant properties of fruit juices used for functional beverages. A: *Food Chemistry* [en línia]. Elsevier Ltd, 2014, Vol. 148, p. 335-341. ISSN 03088146. DOI 10.1016/j.foodchem.2013.10.061. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.10.061>.
32. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2000. DOI 10.1002/14356007.
33. Shazeli, M. et al. Adsorption and Desorption Properties of Total Flavonoids from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Mature Leaf on Macroporous Adsorption Resins. A: *Molecules*. 2020, Vol. 25, núm. 1, p. 1-17.
34. Víctor-Ortega, M.D. i Airado-Rodríguez, D. Revalorization of agro-industrial effluents based on gallic acid recovery through a novel anionic resin. A: *Process Safety and Environmental Protection* [en línia]. Institution of Chemical Engineers, 2018, Vol. 115, p. 17-26. ISSN 09575820. DOI 10.1016/j.psep.2017.08.017. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2017.08.017>.
35. Caetano, M. et al. Phenol removal from aqueous solutions by adsorption and ion exchange mechanisms onto polymeric resins. A: *J. Colloid Interface Sci.* 2009, Vol. 338, p. 402-409.
36. Zhu, Y. et al. Recovery of Flavonoids from Walnuts De-Pellicle Wastewater with Macroporous Resins and Evaluation of Antioxidant Activities In Vitro. A: *Journal of Food Process Engineering*. 2017, Vol. 40, núm. 1, p. 1-9. ISSN 17454530. DOI 10.1111/jfpe.12275.
37. Zagklis, D.P. i Paraskeva, C.A. Purification of grape marc phenolic compounds through solvent extraction, membrane filtration and resin adsorption/desorption. A: *Separation and Purification Technology* [en línia]. Elsevier B.V., 2015, Vol. 156, p. 328-335. ISSN 18733794. DOI 10.1016/j.seppur.2015.10.019. Disponible a: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2015.10.019>.
38. Agalias, A. et al. A new process for the management of olive oil mill waste water and recovery of

natural antioxidants. A: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, Vol. 55, núm. 7, p. 2671-2676. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf063091d.

39. Savarese, M. et al. Biophenol extracts from olive oil mill wastewaters by membrane separation and adsorption resin. A: *International Journal of Food Science and Technology*. 2016, Vol. 51, núm. 11, p. 2386-2395. ISSN 13652621. DOI 10.1111/ijfs.13219.

40. Lakna. What is the Difference Between Mobile Phase and Stationary Phase. A: *13 de Octubre* [en línea]. 2019. [Consulta: 10 juny 2020]. Disponible a: <https://pediaa.com/what-is-the-difference-between-mobile-phase-and-stationary-phase/>.

41. Purification Technologies. A: [en línea]. [Consulta: 4 maig 2020]. Disponible a: <https://www.novasep.com/technologies/purification-technologies.html>.

42. Sun, B. et al. Fractionation of red wine polyphenols by solid-phase extraction and liquid chromatography. A: *Journal of Chromatography A*. 2006, Vol. 1128, núm. 1-2, p. 27-38. ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2006.06.026.

43. Deeb, A.A., Fayyad, M.K. i Alawi, M.A. Separation of Polyphenols from Jordanian Olive Oil Mill Wastewater. A: *Chromatography Research International*. 2012, Vol. 2012, p. 1-8. ISSN 2090-3502. DOI 10.1155/2012/812127.

44. Degenhardt, A. et al. Preparative separation of polyphenols from tea by high-speed countercurrent chromatography. A: *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000, Vol. 48, núm. 8, p. 3425-3430. ISSN 00218561. DOI 10.1021/jf0000833.

45. Val, F. Integració de processos d'extracció i tecnologies de membranes per la separació i recuperació de polifenols de residus agro-alimentaris. A: . 2020,

46. Paraskeva, C.A. et al. Membrane processing for olive mill wastewater fractionation. A: *Desalination*. 2007, Vol. 213, núm. 1-3, p. 218-229. ISSN 00119164. DOI 10.1016/j.desal.2006.04.087.

47. Giacobbo, A., Bernardes, A.M. i De Pinho, M.N. Sequential pressure-driven membrane operations to recover and fractionate polyphenols and polysaccharides from second racking wine lees. A: *Sep. Purif. Technol.* 2017, Vol. 173, p. 49-54.

48. Russo, C. A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). A: *J. Memb. Sci.* 2007, Vol. 288, núm. 1-2, p. 239-246.

49. Fisher scientific. A: [en línea]. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a: <https://www.fishersci.es/>.

50. PanReac AppliChem ITW Reagents. A: [en línea]. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a: <http://www.itwreagents.com/iberia/es/home>.

51. Wanner Hydra-Cell Seal-less Pump Technology. A: [en línea]. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a: <https://www.hydra-cell.co.uk/>.

52. Sistema de cromatografía líquida capilar Agilent Serie 1100 Manual del sistema. A: [en línea]. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a:



https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/Public/G1388-95001_ebook_032081.pdf.

53. Tarifasgasluz by Selectra. A: [en línia]. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a: <https://tarifasgasluz.com/faq/precio-kwh#kwh-precios-fijos>.

54. Job Talent Blog. A: *5 de mayo* [en línia]. 2015. [Consulta: 22 abril 2020]. Disponible a: <https://blog.jobandtalent.com/2015/05/05/sueldos-de-ingenieros-espana/>.

Anexo A

A1. Características de otras membranas de nanofiltración y ósmosis inversa

Tabla 15. Membranas utilizadas en trabajos previos y sus características.(45)

Membrana	Fabricante	Composición de la membrana
Nanofiltración		
TFCS	KMS-Fluid Systems	Poliamida aromática de capa activa
TFC-HR	KMS-Fluid Systems	Amida aromática de capa activa
Ósmosis inversa		
SW30HR	Dow-Filmtec	Poliamida aromática de capa activa con la superficie cubierta de un alcohol de polivinilo
XLE	Dow-Filmtec	Poliamida aromática de capa activa

A2. Resultados previos de nanofiltración y ósmosis inversa

Tabla 16. Rechazo por familias de polifenoles (NF) en el extracto de lías de vino.(45)

Membrana	Rechazo	Permeado
DURACID	Hidroxibenzoicos: $49,5 \pm 6,0\%$ Hidroxicinámicos: $70,5 \pm 3,8\%$ Flavonoides: $69,5 \pm 3,6\%$	Hidroxibenzoicos: 50,5% Hidroxicinámicos: 29,5% Flavonoides: 30,5%

NF90	Hidroxibenzoicos: $53,2 \pm 7,9\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 46,8% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%
NF270	Hidroxibenzoicos: $64,6 \pm 8,5\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 35,4% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%
TFCS	Hidroxibenzoicos: $77,25 \pm 6,2\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 20,2% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%
TFC-HR	Hidroxibenzoicos: $79,8 \pm 0\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 20,2% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%

Tabla 17. Rechazo por familias de polifenoles (NF) en el extracto de orujo de aceite.(45)

Membrana	Rechazo	Permeado
DURACID	Hidroxibenzoicos: $75,3 \pm 3,7\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 24,7% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
NF90	Hidroxibenzoicos: $78,5 \pm 4,6\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 21,5% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
NF270	Hidroxibenzoicos: $63,3 \pm 10,1\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 36,7% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
TFCS	Hidroxibenzoicos: $72,6 \pm 4,6\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 27,4% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
TFC-HR	Hidroxibenzoicos: $81,8 \pm 4,6\%$ Hidroxicinámicos: $75,2 \pm 1,6\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 18,2% Hidroxicinámicos: 24,8% Flavonoides: 9,6%

Tabla 18. Porcentaje de rechazo por familias de polifenoles (OI) para el extracto de lías de vino.(45)

Membrana	Rechazo	Permeado
SW30HR	Hidroxibenzoicos: $79,8 \pm 0\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 20,2% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%
XLE	Hidroxibenzoicos: $79,8 \pm 0\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 20,2% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%
BW30LE	Hidroxibenzoicos: $79,8 \pm 0\%$ Hidroxicinámicos: $72,9 \pm 0\%$ Flavonoides: $71,5 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 20,2% Hidroxicinámicos: 27,1% Flavonoides: 28,5%

Tabla 19. Porcentaje de rechazo por familias de polifenoles (OI) para el extracto de orujo de aceite.(45)

Membrana	Rechazo	Permeado
SW30HR	Hidroxibenzoicos: $83,2 \pm 5,5\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 16,8% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
XLE	Hidroxibenzoicos: $74,4 \pm 2,8\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 25,6% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%
BW30LE	Hidroxibenzoicos: $84,2 \pm 6,9\%$ Hidroxicinámicos: $74,6 \pm 0\%$ Flavonoides: $90,4 \pm 0\%$	Hidroxibenzoicos: 15,8% Hidroxicinámicos: 25,4% Flavonoides: 9,6%